

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktorin: Direktor Prof. Dr. med. M. Dieterich

Die Rolle des terminalen Komplementwegs bei der Pneumokokken-Meningitis



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Carmen Isabelle Murr

aus

Neuburg an der Donau

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München Berichterstatter: apl. Prof. Dr. med. Uwe Ködel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Sören Schubert  
Priv. Doz. Dr. med. Christoph Bidlingmaier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2015

---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Carmen Isabelle Murr geb. Haubner, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle des terminalen Komplementwegs bei der Pneumokokken-Meningitis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1 Einleitung**

- 1.1 Epidemiologie der bakteriellen Meningitis
- 1.2 Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis
- 1.3 Das Komplementsystem
- 1.4 Zielsetzung

### **2 Material und Methoden**

- 2.1 Materialienauflistung
- 2.2 Geräte
- 2.3 Methoden
  - 2.3.1 Liquoranalyse von Patienten
  - 2.3.2 Maus-Modell der Pneumokokken-Meningitis
    - 2.3.2.1 Klinische Untersuchung
    - 2.3.2.2 Versuchsdurchführung
    - 2.3.2.3 Bestimmung der bakteriellen Titer
    - 2.3.2.4 Leukozytenzellzahl im Liquor
    - 2.3.2.5 Quantifizierung von Einblutungen und Messung des Ventrikelvolumens
    - 2.3.2.6 Immunhistochemische Bestimmung von Komplementfaktoren
    - 2.3.2.7 Das neuropathologische Scoresystem
    - 2.3.2.8 Quantitative Analyse von C5a, C5b-C9, Maus-CXCL1, -IL-1 $\beta$ , -sL-Selektin, -IL-6 und -Albumin mittels ELISA
    - 2.3.2.9 Statistische Analyse der Ergebnisse

### **3 Ergebnisse**

- 3.1 Expressionsanalyse
  - 3.1.1 Komplementfaktoren C3a, C5a und C5b-C9 bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis
    - 3.1.1.1 C3a, C5a und C5b-C9-Konzentrationen in Liquorproben von Patienten mit Meningitis
    - 3.1.1.2 Korrelationsanalyse zwischen Liquor-Komplement-Konzentrationen und klinischen Parametern bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis

- 3.1.2 Zeitliches und räumliches Expressionsprofil der Komplementfaktoren C5a und C5b-C9 im Mausmodell
- 3.2 Funktionsanalyse der terminalen Komplementfaktoren C3a, C5a und C5b-C9 im Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis
  - 3.2.1 Die Rolle von C3a im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis
  - 3.2.2 Untersuchung zur Funktion des terminalen Komplementkomplexes an Mäusen mit einer Funktionsverlust-Mutation im C6-Gen sowie an CD59a-defizienten Mäusen
  - 3.2.3 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung des Anaphylatoxins C5a bei der experimentellen Pneumokokken-Meningitis
- 3.3 Experimentelle Untersuchungen zu möglichen neuen adjuvanten Therapiemaßnahmen bei der Pneumokokken-Meningitis
  - 3.3.1 Untersuchungen zur Wirksamkeit von Antikörpern, die entweder gegen C5 oder gegen die Toll-Like-Rezeptoren 2 und 4 gerichtet sind, im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis
    - 3.3.1.1 Effektivität und Wirkung von anti-C5-Antikörpern
    - 3.3.1.2 Untersuchungen zur Wirksamkeit von Anti-TLR2/4-Antikörpern im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis
  - 3.3.2 Untersuchungen zu neuen adjuvanten Behandlungsmaßnahmen bei der Pneumokokken-Meningitis

#### **4 Diskussion**

- 4.1 Einordnung der eigenen Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung
- 4.2 Bewertung der Rolle von C3a, C5a und terminalem Komplementkomplex in der Entzündungsregulation der Pneumokokken-Meningitis
- 4.3 Diskussion der möglichen Wirkmechanismen von C5a
- 4.4 Bedeutung terminaler Komplementfaktoren in der Entzündungskaskade der Pneumokokken-Meningitis
- 4.5 Neutralisation des terminalen Komplementfaktors C5a: eine neue adjuvante Therapieoption bei der Pneumokokken-Meningitis?

#### **5 Zusammenfassung**

**6 Ausblick**

**7 Danksagung**

**8 Literaturverzeichnis**

## 1 Einleitung

### 1.1 Epidemiologie der bakteriellen Meningitis

Unter einer bakteriellen Meningitis versteht man die bakterielle Infektion des Subarachnoidalraums. Dieser wird von der Pia mater und der Arachnoidea begrenzt und ist mit Liquor cerebrospinalis gefüllt. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation erkranken weltweit jährlich 1,2 Millionen Menschen an einer bakteriellen Meningitis. Etwa 180000 Patienten versterben an dieser Erkrankung (van de Beek, 2012). Damit zählt die bakterielle Meningitis weltweit zu den zehn häufigsten Todesursachen, die auf übertragbare Erkrankungen zurückzuführen sind (WHO, Communicable Diseases, 2003). Die häufigste und zudem gefährlichste Form in Europa ist die Pneumokokken-Meningitis (Brouwer et al., 2010b). Nach Hochrechnungen auf der Basis von Inzidenz-, Letalitäts- und Einwohnerzahlen sind in Europa jährlich über 10000 Krankheits- und 2000 Todesfälle zu erwarten (O'Brien et al., 2009). Überdies treten bei bis zu 50% der Überlebenden Folgeschäden auf, wie Hörverlust, fokale neurologische Defizite, epileptische Anfälle oder kognitive Einschränkungen (Arda et al., 2008; Thigpen et al., 2011; Weisfelt et al., 2006). Für die ungünstige Prognose der Pneumokokken-Meningitis werden in erster Linie die in der Akutphase auftretenden intrakraniellen Komplikationen verantwortlich gemacht (Kastenbauer et al., 2003; van de Beek et al., 2004). Die häufigsten intrakraniellen Komplikationen sind zerebrovaskuläre Veränderungen (z. B. Vaskulitis, Vasospasmus), Hydrozephalus und Hirnödem. Die Folgen dieser Komplikationen sind zerebrale Perfusionsstörungen und eine intrakranielle Druckerhöhung, die eine Einklemmung und/oder zerebrale Infarkte mit teilweise ausgeprägten Gewebeschädigungen verursachen können, die letztendlich die neurologischen Folgeschäden oder gar Tod bedingen können (Koedel et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011).

In der Epidemiologie der bakteriellen Meningitis gab es in den letzten Jahrzehnten deutliche Veränderungen: Seit der erfolgreichen Einführung der Impfung gegen *Haemophilus influenzae* in den Industriestaaten hat sich das mittlere Erkrankungsalter vom jungen Kindesalter ins Erwachsenenalter verschoben (Brouwer et al., 2010b). Etwa 2/3 der bakteriellen Meningitiden werden in den USA und Europa von *Streptococcus pneumoniae* verursacht, während *Haemophilus influenzae*-Fälle, die zuvor die Mehrheit darstellten, sehr selten geworden sind (Arda et al., 2008; Thigpen et al., 2011; van de Beek et al., 2006). Die Einführung eines heptavalenten Impfstoffs gegen Pneumokokken

im Jahr 2000 in den USA und 2001 in Europa führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme invasiver Pneumokokkenerkrankungen. Die Inzidenzraten der Pneumokokken-Meningitis gingen in Abhängigkeit von Lebensalter und -ort unterschiedlich stark (um 5% bis über 90%; in Deutschland um etwa 50%) zurück (van der Linden et al., 2012; Thigpen et al., 2011; Tin Tin et al., 2013). Allerdings dürften die Serotypen-Vielfalt, der Serotypen-Austausch, das Auftreten neuer Serotypen (durch Transformation und homologe Rekombination von Kapselgenen) sowie die breite Altersverteilung bei der Pneumokokken-Meningitis (trotz der Weiterentwicklung der Impfstoffe) einen ähnlichen Impferfolg wie bei *Haemophilus influenzae* Typ B verhindern. Daher wird einer möglichst wirkungsvollen Behandlung auch weiterhin große Bedeutung zukommen. Für eine möglichst effiziente Therapie ist das Verständnis der Pathophysiologie essentiell. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über bisherige Erkenntnisse in diesem Bereich.

## 1.2 Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis

Betrachtet man die Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis genauer, so wird die ungünstige Prognose, die diese Infektionserkrankung mit sich bringt, verständlich. Dabei spielen vor allem die massive körpereigene Immunreaktion und der Ort der Infektion eine Rolle. Im Bereich der Leptomeningen und im mit Liquor gefüllten Subarachnoidalraum kann das Immunsystem Pathogene wie *Streptococcus pneumoniae* nur schlecht erkennen und bekämpfen (Simberkoff et al., 1980). Ursache hierfür ist eine konstitutionelle Immunschwäche, die unter anderem auf die Blut-Hirn-Schranke und das damit verbundene besondere Milieu im Liquorraum zurückzuführen ist. Die Schranke verhindert, dass der Großteil der Blutbestandteile in den Liquor gelangt (Arda et al., 2008; Pachter et al., 2003). So sind zum Beispiel lösliche Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs), die für die Detektion und Opsonierung von Bakterien essentiell sind, nur in sehr geringem Maß im Liquorraum vorhanden (Dujardin et al., 1985; Stahel et al., 1997c). Ferner finden sich dort nur wenige immunkompetente Zellen, wie ortständige Makrophagen und dendritische Zellen, und es fehlt ein funktionsfähiges Lymphabflusssystem. Dadurch ist die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen in Lymphknoten, die für eine Abwehrreaktion entscheidend ist, nur bedingt möglich (Johnston et al., 2004). Darüber hinaus werden Immunreaktionen durch im Liquor vorhandene anti-inflammatorische Faktoren noch zusätzlich unterdrückt (Niederkorn,

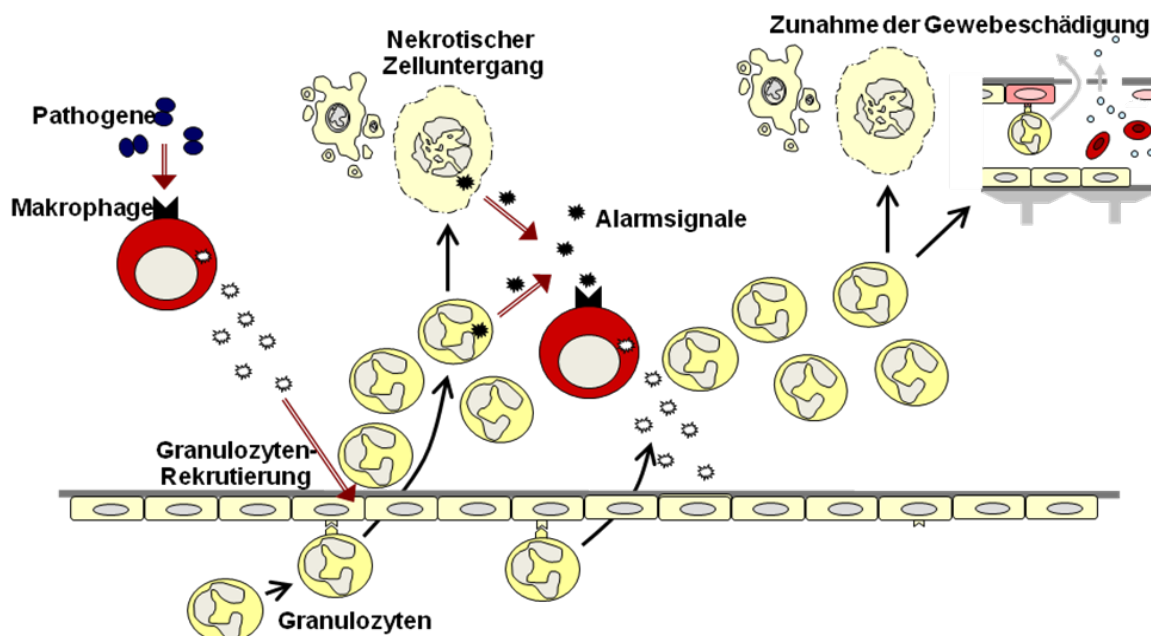


2006). Diese besonderen Umstände bewirken, dass eingedrungene Pneumokokken sich zunächst fast ungehindert vermehren können. Erst nach autolytischen Prozessen, die durch bakterielle Enzyme bei widrigen Wachstumsbedingungen (z. B. am Ende der exponentiellen Wachstumsphase) hervorgerufen werden, kommt es zur Freisetzung von subkapsulären Bakterienbausteinen (Lewis, 2000), die schließlich zur Aktivierung des Immunsystems führen.

Im ersten Schritt der Immunreaktion werden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) gebunden. Die PAMPs der Pneumokokken sind in erster Linie das Toxin Pneumolysin und die Zellwandbestandteile Peptidoglykan und Lipoteichonsäure (Tuomanen et al., 1985; Weisfelt et al., 2006). Wie Schneider et al. (1999) belegten, ist eine hohe Konzentration dieser bakteriellen Zellwandbestandteile mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert. Zentrale PRRs bei der Erkennung von Pneumokokken im Liquorraum scheinen die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 (Klein et al., 2008) zu sein, die sich außen an der Zellmembran immunkompetenter Zellen befinden (Koedel, 2009). Durch eine intrazelluläre Kaskade, in der das Adaptermolekül MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) eine Schlüsselposition einnimmt (Koedel et al., 2004), werden Transkriptionsfaktoren wie Nukleärer Faktor (NF)- $\kappa$ B und Aktivatorprotein (AP)-1 aktiviert (Koedel et al., 2000; Tsuchiya et al., 2007). Dadurch wird die Expression von Zytokinen, Chemokinen sowie bestimmten Adhäsionsmolekülen stark hochreguliert (Koedel et al., 2002a; Nau et al., 2002; Weber et al., 2007). Diese Entzündungsmediatoren, zum Beispiel Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und C-X-C-Motiv-Chemokin Ligand-1 (CXCL-1), regen aktivierte Leukozyten an, aus der Blutbahn in den Liquorraum einzuwandern (Lahrtz et al., 1998; Spanaus et al., 1997). Wie Ernst et al. (1983) gezeigt haben, arbeiten diese Immunzellen (hauptsächlich neutrophile Granulozyten) im subarachnoidalen Raum jedoch nicht effektiv; sie können die Bakterien ohne zusätzliche Antibiotikatherapie nicht eliminieren. Bei ihrem Kampf gegen die Pathogene setzen sie zytotoxische Substanzen (z. B. Proteasen und Oxidantien) frei, die wiederum zu Kollateralschäden im körpereigenen Gewebe führen können. So kann beispielsweise die Funktion der Blut-Hirn-Schranke stark beeinträchtigt werden (Kim, 2003; Klein et al., 2006a; Koedel et al., 2002a; Nau et al., 2002) (Abb. 1). Durch den Einsatz von Antibiotika können die Erreger zwar erfolgreich abgetötet werden, aber die dadurch induzierte Lyse der Pathogene führt zur Freisetzung einer großen Menge an subkapsulären Bakterienbausteinen. Die Folge ist eine erhebliche Zunahme der

Entzündungsreaktion (der sogenannte „inflammatory burst“), die wiederum erhebliche Schäden im körpereigenen Gewebe verursachen kann (Kastenbauer et al., 2002; Klein et al., 2006b; Koedel et al., 1999) .

Abb. 1: Konzept zur Pathogenese bei der bakteriellen Meningitis



Anmerkung: Bindung von Bakterienbestandteilen an Makrophagen führt zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Diese wirken auf Granulozyten chemotaktisch, so dass letztere in den Liquorraum einwandern und dort zytotoxische Substanzen absondern. Umliegende Zellen, die dadurch geschädigt werden, sondern Alarmsignale ab, die Makrophagen zur erneuten Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen anregen. Die Granulozyten-Rekrutierung und damit auch die Gewebeerstörung nehmen somit mit der Zeit zu.

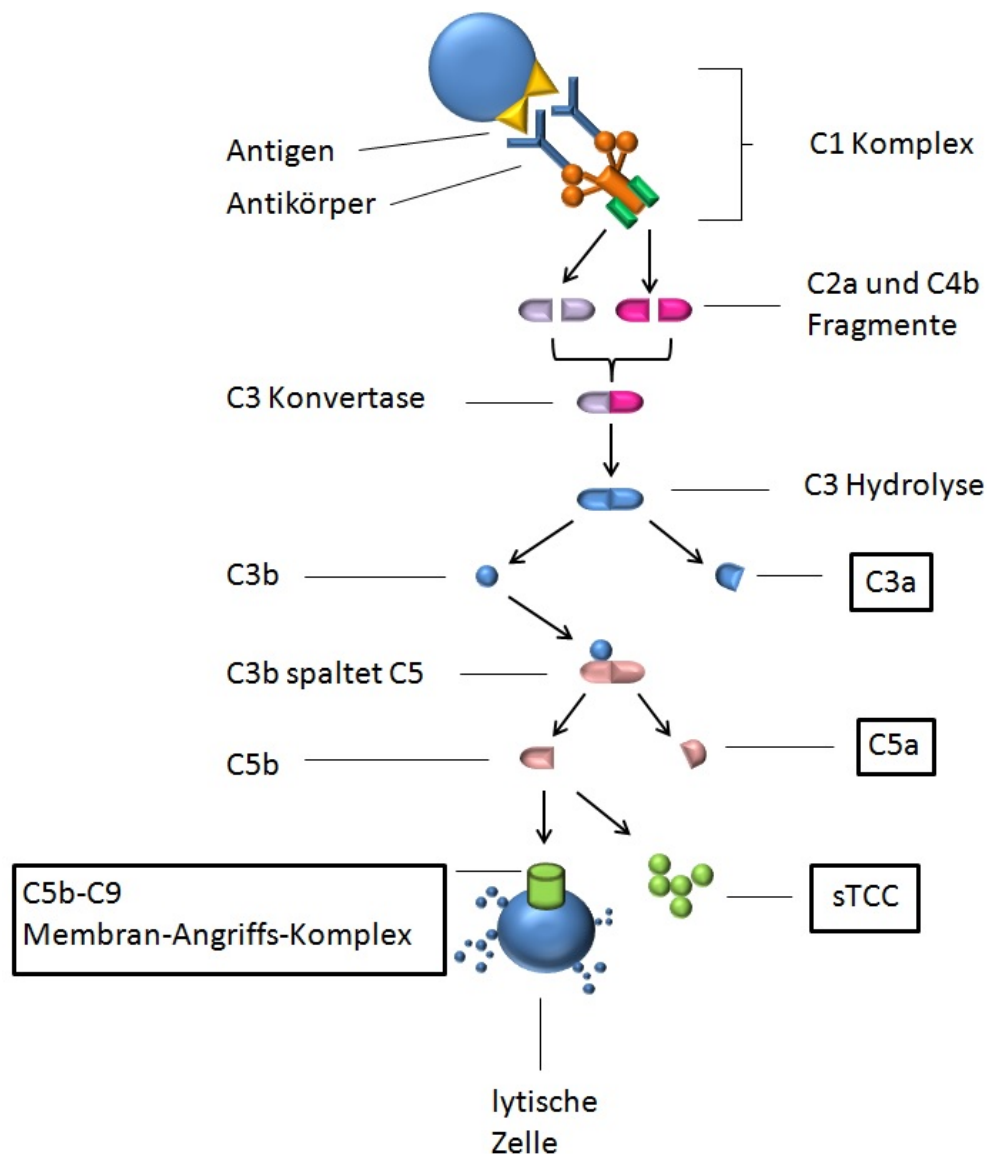
Die verheerenden Komplikationen sind somit nicht nur Folge der Schäden, die unmittelbar von den Bakterien verursacht werden, vielmehr trägt die überschießende Immunantwort auf die Anwesenheit bakterieller Zellwandbestandteile in großem Maße zu deren Entstehung bei (Jain et al., 2000; Klein et al., 2006a; Koedel et al., 2002a; Nau et al., 2002; Weber et al., 2007). Typische Folgeschäden sind zum Beispiel Hirnödeme mit Gefahr der Einklemmung, zerebrovaskuläre Komplikationen (z. B. Arteriitis, venöse Thrombosen, Vasospasmus, und intrakranielle Blutungen), Zerebritiden und Hydrozephalus (Kastenbauer et al., 2003; Pfister et al., 1993; Weisfelt et al., 2006).

### 1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil des Immunsystems und dient vor allem dem Schutz vor Infektionen, moduliert aber auch Entzündungsprozesse und nimmt Einfluss auf Apoptose und Autophagie. Es besteht aus über 30 Komponenten, die löslich oder membrangebunden vorliegen, und wird durch den klassischen, alternativen oder Lectin-Weg aktiviert (siehe Übersichtsarbeiten: Ali et al., 2012; Gasque, 2004; Skattum et al., 2011). Bei einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* werden alle drei Aktivierungswege in Gang gesetzt (Brown et al., 2002). Dabei scheint vor allem der klassische Komplementweg ausschlaggebend zu sein (Brown et al., 2002). Es entstehen Bindungen zwischen Antigen-Antikörperkomplexen und dem Komplementfaktor C1q (Abb. 2). Das wiederum führt zur Bildung der C3-Konvertase, die C3 in C3a und C3b aufspaltet. Die Bindung von C3b an bakterielle Antigene ist ausschlaggebend für die Opsonophagozytose von Pneumokokken. C3a und C5a fungieren als Anaphylatoxine; sie wirken chemotaktisch, zum Beispiel auf Granulozyten und Makrophagen, und können die Gefäßpermeabilität erhöhen (Skattum et al., 2011). Zudem können Anaphylatoxine, vor allem C5a, die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen induzieren (Ricklin et al., 2010). Der terminale Komplementkomplex, der sich aus den Faktoren C5b-C9 zusammensetzt, führt membrangebunden als Membran-Angriffs-Komplex (MAC) zur Lyse Gram-negativer Bakterien, wie zum Beispiel von *Neisseria meningitidis* (Frank et al., 1987). In seiner löslichen Form (sTCC: löslicher terminaler Komplement-Komplex) kann er auch pro-inflammatorische und chemotaktische Effekte vermitteln: beispielsweise beobachteten Casara et al. (2003) nach einer intrazerebroventrikulären Injektion von sTCC bei Ratten erhöhte Leukozytenzahlen im Liquor. Zusätzlich stieg die Liquor-Konzentration von IL-1 $\beta$  deutlich an. Ähnlich wie die Anaphylatoxine C3a und C5a kann sTCC auch die Gefäßpermeabilität erhöhen (Bossi et al., 2004).

Einen Überblick über die Komplementkaskade gibt Abbildung 2.

Abb. 2 : Der klassische Komplementweg



Anmerkung: Beim klassischen Aktivierungsweg setzt in der Regel ein Antigen-Antikörper-Komplex die Komplement-Kaskade in Gang. Alle Aktivierungswege münden in der Aktivierung des zentralen Komplementfaktors C3 und führen zur Produktion der Anaphylatoxine C3a, C5a sowie des terminalen Komplementkomplexes C5b-C9. Letzterer liegt zum einen membrangebunden als Membran-Angriffs-Komplex, zum anderen in löslicher Form als sTCC vor.

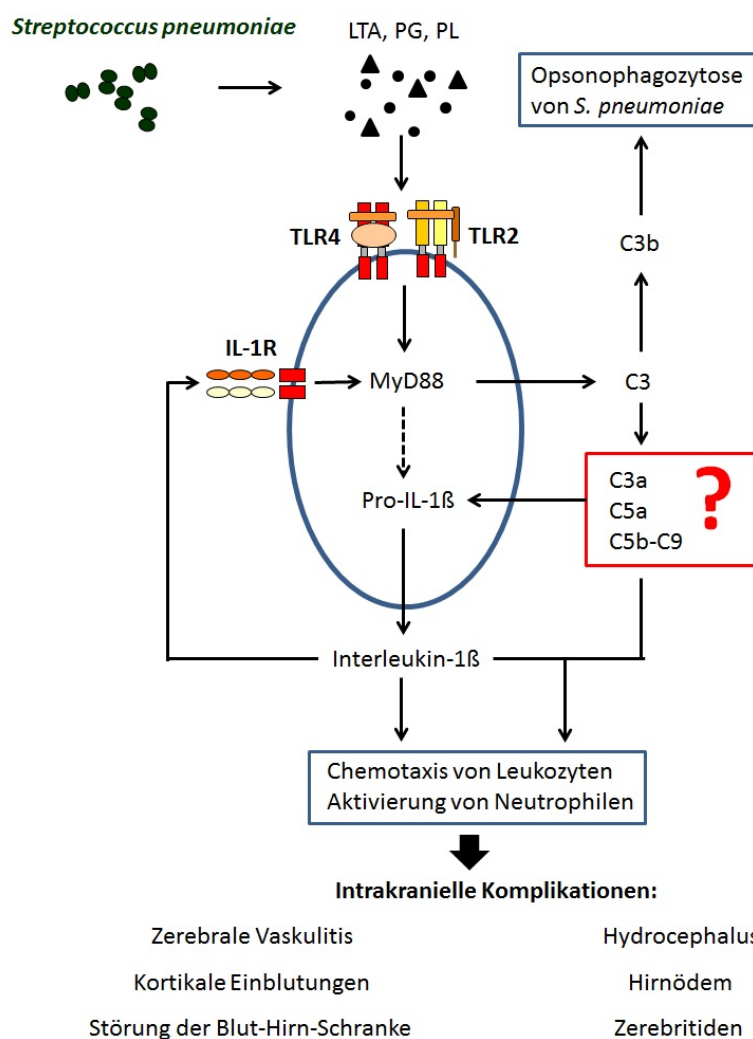
Erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss des Komplementsystems auf den Verlauf der Pneumokokken-Meningitis lieferten Untersuchungen von Tuomanen et al. aus dem Jahre 1986: Zur Analyse der Funktion des Komplementsystems wurden Kaninchen vor der Krankheitsinduktion mit Kobra-Gift-Faktor (cobra venom factor, CVF) behandelt, einem Komplement-aktivierenden Protein, das in der Folge eine Dekomplementierung verursacht und funktionell dem Komplementfaktor C3b entspricht (Kock et al., 2004).

Aufgrund der Wirkung von CVF war die Opsonophagozytose nach intrazisternaler Infektion mit Pneumokokken geringer ausgeprägt als bei Kontrolltieren, was sich in höheren bakteriellen Titern im Liquor und Blut als bei unbehandelten, infizierten Kaninchen äußerte. Diese (induzierte) Abwehrschwäche hatte eine erhöhte Sterblichkeitsrate zur Folge. Die Depletion des Komplementsystems ging ferner mit einer zeitlichen Verzögerung der Leukozyteneinwanderung in den Liquorraum einher, hatte jedoch keine signifikante Wirkung auf das Ausmaß der Leukozyteneinwanderung. Somit lag der Haupteffekt der pharmakologischen Komplementdepletion in einer eingeschränkten Fähigkeit der behandelten Kaninchen, die Pneumokokken im Liquorraum und im Blut suffizient abzutöten, während die Entzündungsreaktion nicht ausschlaggebend beeinflusst wurde.

Betrachtet man nun die Konzentrationen der Komplementfaktoren im ZNS, stellt man fest, dass diese unter physiologischen Bedingungen beinahe vollständig fehlen (Rupprecht et al., 2007; Simberkoff et al., 1980). Unsere Arbeitsgruppe zeigte in früheren Untersuchungen, dass die Expression von Komplementfaktoren, wie C1q, C1r, C3 und der C3a-Rezeptor, im Zentralnervensystem im Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis innerhalb von 24 Stunden nach Infektion signifikant hoch reguliert wird (Rupprecht et al., 2007). Bei Patienten mit einer bakteriellen Meningitis war von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls ein Anstieg der Konzentrationen von Komplementfaktoren und der Komplement-assoziierten opsonierenden Aktivität im Krankheitsverlauf einer bakteriellen Meningitis beobachtet worden (Stahel et al., 1997c; Zwahlen et al., 1982). Zur Charakterisierung der funktionellen Rolle des Komplementsystems setzte unsere Arbeitsgruppe Mäusestämme ein, denen entweder C3 oder C1q fehlte. Beide Stämme wiesen nach Infektion niedrigere Liquorleukozytenzahlen und geringere Zytokin-Konzentrationen im Gehirn (z. B. IL-1 $\beta$ , CXCL-1 und CXCL-2) als Wildtypmäuse auf. Die abgeschwächte Immunantwort ging mit weniger ausgeprägten intrakraniellen Komplikationen, wie z. B. einem geringer-gradigen Anstieg des intrakraniellen Druckes, einher. Sowohl die C1q- als auch die C3-Defizienz wurden zudem von einer Störung der Opsonophagozytose der Pneumokokken begleitet, was aus erhöhten bakteriellen Titern im ZNS ersichtlich wurde. Daraus resultierte wiederum eine höhergradige, sekundäre Bakteriämie, die zu einer Zunahme Meningitis-assoziiierter systemischer Komplikationen (wie z. B. der Pneumonie) und folglich der Sterblichkeitsrate führte (Rupprecht et al., 2007). Diese Studie demonstrierte, dass das Komplementsystem eine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis spielt.

Es blieb jedoch ungeklärt, welche Komplementfaktoren für die immunmodulatorische Wirkung verantwortlich sind. Wie oben erwähnt, könnten sowohl die Anaphylatoxine C3a und C5a als auch sTCC diese Effekte vermitteln. Abbildung 3 veranschaulicht mögliche Funktionen von Komplementfaktoren in der Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis.

Abb. 3: Der terminale Komplementweg bei der Pneumokokken-Meningitis



Anmerkung: Autolyse und Antibiotikatherapie führen zur massiven Freisetzung von Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglykan (PG) und Pneumolysin (PL), die durch Bindung an TLR2/4 Rezeptoren immunkompetente Zellen aktivieren. Über den MyD88-abhängigen Signalweg exprimieren diese dann zahlreiche Entzündungsmediatoren, wie IL-1 $\beta$  und Komplementfaktor C3. IL-1 $\beta$  kann über einen positiven Feedback-Mechanismus zu einer Aufrechterhaltung und Verstärkung der MyD88-abhängigen Entzündungsreaktion beitragen. Das Komplementsystem ist einerseits für die Bekämpfung der Pneumokokken (für deren Opsonophagozytose) essentiell, andererseits kann es über MyD88-unabhängige Wege die Immunreaktion modulieren. Die immunmodulatorischen Effekte könnten durch Anaphylatoxine, wie C3a und C5a, oder durch den löslichen terminalen Komplex, C5b-C9, vermittelt werden.

## 1.4 Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit liegt in der Charakterisierung der Rolle der Anaphylatoxine C3a und C5a sowie des terminalen Komplementkomplexes in der Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis.

Im Einzelnen sollten zunächst die Konzentrationen dieser Komplementfaktoren in Liquorproben von Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis (im Vergleich zu Kontrollpatienten) bestimmt und die entsprechenden Messwerte mit klinischen Parametern wie der Liquorpleozytose korreliert werden. Diese Ergebnisse sollten eine mögliche Bedeutung dieser Faktoren in der Klinik aufzeigen.

In der nächsten Versuchsphase sollte durch Einsatz verschiedener transgener Mäusestämme (bzw. von Mäusen mit einer bekannten Spontanmutation im C6-Gen) die Bedeutung der Komplementfaktoren C3a, C5a und C5b-C9 erfasst werden. Diese Untersuchungen wurden in einem etablierten Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse 24 Stunden nach der Infektion klinisch evaluiert und nachfolgend sowohl physiologisch als auch pathologisch analysiert.

In einer abschließenden Versuchsreihe sollte dann überprüft werden, ob der pathogenetisch entscheidende Komplementfaktor einen potentiellen Angriffspunkt für eine adjuvante Behandlung der Pneumokokken-Meningitis darstellt. Dabei wurde ein kliniknahes Mausmodell verwendet, in dem die Mäuse 24 Stunden nach der Infektion antimikrobiell behandelt werden. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass in diesem Mausmodell neurologisch-pathologische Veränderungen beobachtet werden, die denen von Patienten sehr ähnlich sind (Kastenbauer et al., 2003; Klein et al., 2006b). Ferner sollte die Wirkung dieser Behandlungsmaßnahme mit zwei alternativen adjuvanten Therapiemaßnahmen verglichen werden: [i] mit der Gabe von Dexamethason, dem einzigen Arzneimittel mit erwiesener Wirkung in der adjuvanten Behandlung der Pneumokokken-Meningitis (Brouwer et al., 2013, Deutsche Gesellschaft für Neurologie Leitlinien, Stand 2012), und [ii] mit der Applikation von Antikörpern gegen TLR2 und TLR4. Dieser innovative Therapieansatz basiert auf Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, dass diese beiden Mustererkennungsrezeptoren entscheidend zur Immunaktivierung bei einer Pneumokokkeninfektion des Liquorraums beitragen (Klein et al., 2008; Koedel, 2009).

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialienauflistung

- Anti-Albumin Antikörper:
  - Polyklonaler Antikörper gegen murines Albumin BP225 (Bethyl Laboratories INC., Montgomery, Texas, USA)
  - Ziegen anti-Maus Albumin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (A 90-134P) (Bethyl Laboratories INC)
- Anti-C5-AK [BB5.1] (Hycult Biotech, Beutelsbach, Deutschland)
- Anti-Maus-C5a-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)
- Anti-Maus-IgG (Innovative Research, Navi, Missouri, USA)
- Anti-TCC-Antikörper (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt)
- Anti-TLR2- und -4-Antikörper [T2.5 und 1A6] (Hycult Biotech und Novimmune, Genf, Schweiz)
- Aprotinin (Hemmstoff der Serinprotease Plasmin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- an Meerrettichperoxidase gebundenes Avidin/Biotin (Vectastain ABC Kit; Bethyl Laboratories INC.)
- Blutagarplatten (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, USA)
- BSA (bovines Serumalbumin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Ceftriaxon (MIP Pharma, Blieskastel, Deutschland)
- Zitrat-Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Cross-Down Buffer: Puffer zur Kreuzreaktivitätsminimierung (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Dexamethason (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland)
- 3,3'-Diaminobenzidin (Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA)
- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay)-Kits:
  - Maus C5a und C5b-C9-ELISA (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China)
  - Maus-CXCL1/KC-ELISA (R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA)
  - Maus IL-1 $\beta$ -ELISA (R&D Systems)
  - Maus sL-Selektin-ELISA (R&D Systems)
  - Maus IL-6-ELISA (R&D Systems)
  - Maus CXCL2/MIP-2 (R&D Systems)



- humane C3a, C5a bzw. sC5b-C9 Plus ELISA (Micro-Vue von Quidel, San Diego, Kalifornien, USA)
- EMSA A bestehend aus:
  - 10mM KCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland )
  - 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (Merck KGaA)
  - 10mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Merck KGaA)
- Farbreaktionslösung A + B (R&D Systems)
- HCl (Merck KGaA)
- Heparin (Ratiopharm GmbH)
- Histoacryl-Gewebekleber (B Braun, Sempach, Schweiz)
- Isofluran (Abbott Laboratories, Illinois, USA)
- Ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland)
- Leupeptin Trifluoroacetat Salz (90% HPLC; AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland)
- Lidocain (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Mäusestämme:
  - C57BL/6-Mäuse (Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA)
  - BALB/c-Mäuse (Charles River)
  - C3aR<sup>-/-</sup> (genetischer Hintergrund: C57BL/6; Prof. Scott Barnum, Universität Alabama, Mikrobiologisches Institut, Birmingham, Alabama, USA)
  - C3a/GFAP (genetischer Hintergrund: C57BL/6; Prof. Scott Barnum,)
  - C6<sup>mutant</sup> (genetischer Hintergrund: C57BL/6; Paul B Morgan, Cardiff University, Cardiff, England)
  - CD59a<sup>-/-</sup> (genetischer Hintergrund: C57BL/6; Paul B Morgan)
  - C5aR<sup>-/-</sup> (genetischer Hintergrund: BALB/c; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Main, USA via Charles River)
- Maus-Referenz-Serum (RS 10-101-5) (Bethyl Laboratories INC.)
- Mayers Hämatoxylin (Merck KGaA)
- Natriumcarbonat (Merck KGaA)
- PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Pepstatin A (Mikrobieller Ursprung; hemmt Aspartatproteasen; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

- Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF (Serinproteaseinhibitor; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Roti – Nanoquant (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Schwefelsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39 Stamm, Prof. Sven Hammerschmidt, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Greifswald, Deutschland)
- Trizma Base und Trizma HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Türck'sche Lösung (Merck KGaA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Xylazin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Ziegenserum (Bethyl Laboratories INC.)

## 2.2 Geräte

- CryoCutter CM3050 (Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Digitalthermometer GTH 1160, (Greisinger Electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland)
- Druckwandler (Ohmeda GmbH und Co. KG, Erlangen, Deutschland)
- Mikrotiterplatten-Multimode Reader Tristar LB 941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland)
- Fuchs-Rosenthal Zählkammer mit 0,200mm Tiefe; 0,0625 mm<sup>2</sup> Assistent (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland)
- Vortexer (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Hera safe (Thermo electron corporation, Bonn, Deutschland)
- Kern KB Präzisionswaage (Gottl. Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland)
- Kern ABJ Analysewaage (Gottl. Kern und Sohn GmbH)
- Photometer Ultraspec 500/1100 pro (Amersham, BD Biosciences, San Jose, Kanada)
- Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Precidor Infusionspumpe, (InforsHT AG Basel, Bottmingen, Schweiz)
- Sirecust 403R Patientenmonitor (Siemens, München, Deutschland)

- Spectrometer, Ultrospec 500/1100 pro (Amersham Biosciences, Gattbrugg, Schweiz)
- Ultraschallbad, Laboson 200 (Bender & Hobein GmbH Labortechnik, Bruchsal, Deutschland)
- Licht/Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51-LM (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Videokamera Moticam 5000 (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Zeiss Axiovert Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
- Zentrifuge 5415C (Eppendorf AG)
- Zentrifuge 5415R, (Eppendorf AG)

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Liquoranalyse von Patienten

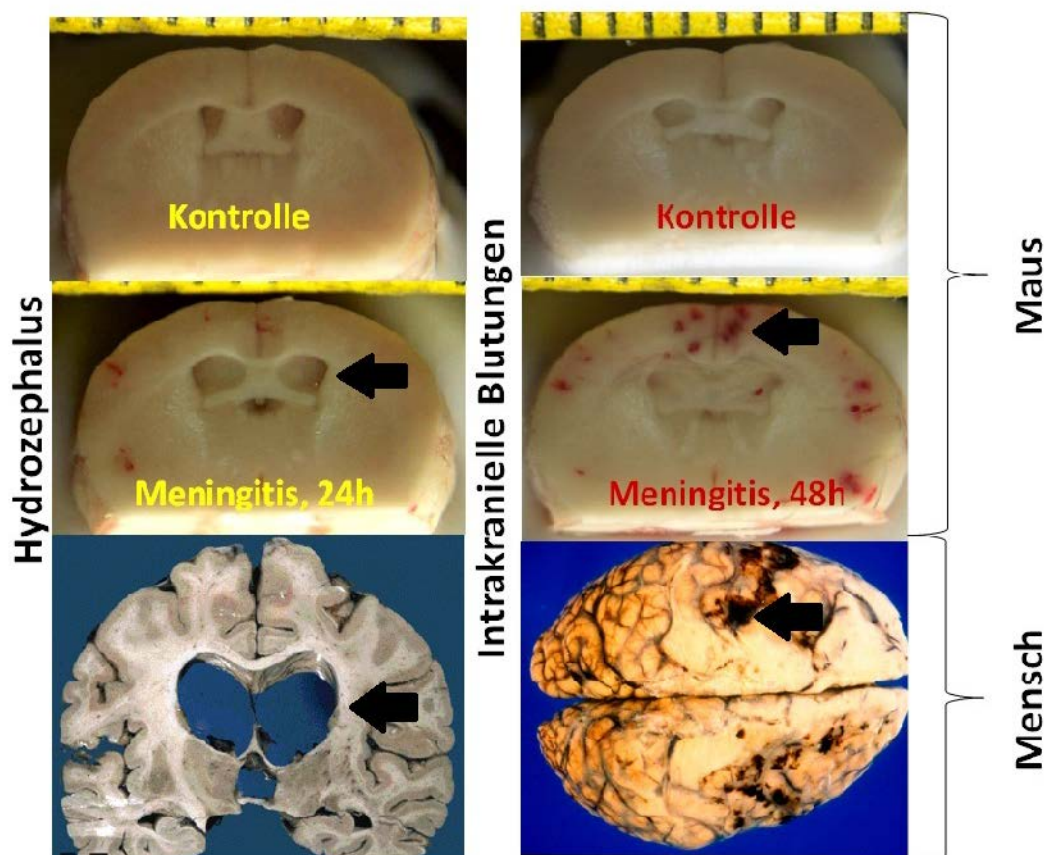
Die Liquorproben (inkl. anonymisierter laborchemischer und klinischer Daten) wurden uns von unserem Kooperationspartner Prof. Diederik van de Beek (Neurologische Abteilung, Universität Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden Proben von jeweils 15 Patienten mit Pneumokokken-Meningitis, mit viraler Meningitis oder mit einer nicht-infektiösen, nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankung (8 x Migräne, 1 x Spannungskopfschmerz, 1x Bandscheibenvorfall, 5 x Fazialisparese) analysiert. Die Konzentrationen der Komplementfaktoren C3a, C5a und sC5b-C9 wurden entsprechend der Anleitungen des Herstellers mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Kits der Firma Quidel (Micro-Vue C3a, C5a bzw. sC5b-C9 Plus ELISA) gemessen. Der Zusammenhang von C3a-, C5a- und sC5b-9-Spiegel mit klinischen (Glasgow-Koma-Skala, Glasgow-Outcome-Skala) und laborchemischen Parametern (Leukozytenanzahl, Glukose, Protein, Albuminquotient) wurde mittels Korrelationsanalyse nach Spearman ermittelt. Mit Hilfe der Glasgow-Koma-Skala lässt sich das Ausmaß einer Bewusstseinsstörung bzw. die Hirnfunktionsstörung zum Aufnahmezeitpunkt beurteilen. Dabei werden das Augenöffnen, die beste verbale und die beste motorische Antwort des Patienten berücksichtigt (Teasdale et al., 1974). Durch die Glasgow-Outcome-Skala kann man Patienten nach abgelaufener Krankheit oder Trauma anhand der Schwere der verbliebenen Schädigung in verschiedene Gruppen einteilen (Jennett et al., 1975). Der Albuminquotient gibt Anhalt für eine Störung der Blut-Hirn-

Schranke und errechnet sich aus der Albumin-Konzentration im Liquor dividiert durch die Albumin-Konzentration im Serum (Normwert beim Erwachsenen:  $< 8 \times 10^{-3}$ ).

### 2.3.2 Maus-Modell der Pneumokokken-Meningitis

Die Experimente wurden in einem etablierten Maus-Modell durchgeführt, mit dem die menschliche Erkrankung sehr gut nachvollzogen werden kann (Klein et al., 2006b). Analog zu Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis entwickeln infizierte Mäuse Meningitis-typische intrakranielle Komplikationen, wie beispielsweise einen Anstieg des intrakraniellen Drucks, ein vasogenes Hirnödem oder aber, wie in Abbildung 4 gezeigt, einen Hydrozephalus sowie kortikale Blutungen. Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2531-32-04; AZ 55.2-1-54-2532-130/06). Die einzelnen Versuchsgruppen sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Abb. 4: Vergleich von Hydrozephalus und intrazerebralen Blutungen bei Maus und Mensch mit Pneumokokken-Meningitis



Erweiterte intrazerebrale Liquorräume  
(Pathologien siehe Pfeile)

Intrazerebrale Blutungen  
(Pathologien siehe Pfeile)

Tab. 1: Versuchsgruppen im Maus-Modell

Gruppen	Versuchsmodell	Stamm	Geschlecht	Anzahl der Versuchstiere
Wildtyp-Kontrollen	24h-PBS	C57BL/6 BALB/c	m m	8 6
Wildtyp (infiziert)	24h-Infektion	C57BL/6 C57BL/6 BALB/c	m w m	12 20 10
C3aR <sup>-/-</sup>	24h-Infektion	C57BL/6	m	12
C3a/GFAP	24h-Infektion	C57BL/6	m	11
C6 <sup>mutant</sup>	24h-Infektion	C57BL/6	w	14
CD59a <sup>-/-</sup>	24h-Infektion	C57BL/6	w	11
C5aR <sup>-/-</sup>	24h-Infektion	BALB/c	m	9
C5-AK 1 mg/Maus i.p.	24h-Infektion	C57BL/6	m	7
Anti-IgG 1 mg/Maus i.p.	24h-Infektion	C57BL/6	m	12
TLR 2/4-AK je 0,75 mg/Maus i.p.	24h-Infektion	C57BL/6	m	5
Anti-IgG 1,5 mg/Maus i.p.	24h-Infektion	C57BL/6	m	5
C5-AK 1 mg/Maus i.p.	48h-Therapie	C57BL/6	m	10
TLR 2/4-AK je 0,75 mg/Maus i.p.	48h-Therapie	C57BL/6	m	8
Anti-IgG 1,5 mg/Maus i.p.	48h-Therapie	C57BL/6	m	21

Dexamethason 0,5 mg/kg i.p.	48h-Therapie	C57BL/6	m	10
Kontrollen 250 µl PBS/Maus i.p.	48h-Therapie	C57BL/6	m	16

Legende: Im 24h-Infektionsversuch werden die Mäuse 24 Stunden nach intrazisternaler Infektion mit Pneumokokken auf verschiedene Testparameter hin untersucht. Beim 48h-Therapieversuch werden die Versuchstiere zuerst infiziert, nach 24 Stunden klinisch evaluiert sowie mit Ceftriaxon und einem entzündungshemmenden Arzneimittel therapiert und nach 48 Stunden erneut untersucht. PBS: Phosphat gepufferte Salzlösung; C3aR<sup>-/-</sup>: C3a-Rezeptor-Defizienz; C3a/GFAP: C3a wird von Astrozyten im ZNS überexprimiert; C6<sup>mutant</sup>: Spontanmutante im C6-Gen; CD59a<sup>-/-</sup>: CD59a-Defizienz; C5aR<sup>-/-</sup>: C5a-Rezeptor-Defizienz; C5-AK: anti-C5-Antikörper [BB5.1]; TLR2/4-AK: anti-TLR2- und 4-Antikörper [T2.5 und 1A6]; Anti-IgG: Anti-Maus-IgG; i.p.: intraperitoneale Applikation; m: männliches Geschlecht; w: weibliches Geschlecht;

### 2.3.2.1 Klinische Untersuchung

Bei der klinischen Evaluation der Mäuse wurden zunächst ihr Gewicht und ihre Körpertemperatur gemessen, danach ein sogenannter klinischer Score bestimmt. Das Scoresystem umfasste folgende Parameter:

- die Körperhaltung beim „Postural Reflex Test“ (Bederson, 1986). Die Maus wurde dazu am Schwanz leicht angehoben und ihre Körperhaltung begutachtet. Extendierte sie alle vier Extremitäten symmetrisch, erhielt sie 0 Scorepunkte. Bog die Maus den Rumpf in eine Richtung ab, drehte sie sich um die eigene Körperachse oder zeigte sie keinerlei Körperbewegungen, dann wurden ihr 1,2 oder 3 Scorepunkte zugeteilt.
- die motorische Fähigkeit, die anhand eines „Beam Balancing Tests“ bestimmt wurde. Die Versuchstiere wurden hierzu auf drei Holzstäbe mit abnehmendem Durchmesser (13,5 mm; 9 mm; 3,5 mm) gesetzt. Konnte das Versuchstier auf dem dünnsten Stab laufen, so erhielt es den Scorewert 0. Wenn es lediglich darauf stehen konnte, wurde der Score von 1 vergeben. In gleicher Weise wurden die Punkte 2 und 3 für den Stab mit 9 mm Dicke vergeben sowie die Punkte 4 und 5 für den Stab mit dem Durchmesser von 13,5 mm. Fiel die Maus von allen Stäben, so erhielt sie den Scorewert von 6.
- der Fellstatus, der entweder mit glatt (= 0 Scorepunkte) oder struppig/glanzlos/verschmutzt (= 1 Scorepunkt) beschrieben wurde.

- die Vigilanz, die mit einem Score von 0 (= wach) oder 1 (= lethargisch) bewertet wurde.
- das Vorkommen von Krampfanfällen. Der Wert 1 sagte dabei aus, dass die Maus gekrampft hatte, und 0 beschrieb die Abwesenheit von Krämpfen.

Der klinische Score reichte somit von 0-12 Punkten. Gesunde Mäuse wiesen einen Scorewert von 0 Punkten auf, ein Scorewert von > 10 wurde bei schwer erkrankten Mäusen beobachtet.

Zusätzlich zum klinischen Status wurde die spontane motorische Aktivität im „Open Field Test“ überprüft (Gould, 2009). Hierbei wurde die Maus auf das mittlere von neun Feldern einer 42 x 42 x 20 cm großen Box gesetzt und die Anzahl der Felder gezählt, die sie innerhalb von zwei Minuten mit den Vorderpfoten betrat.

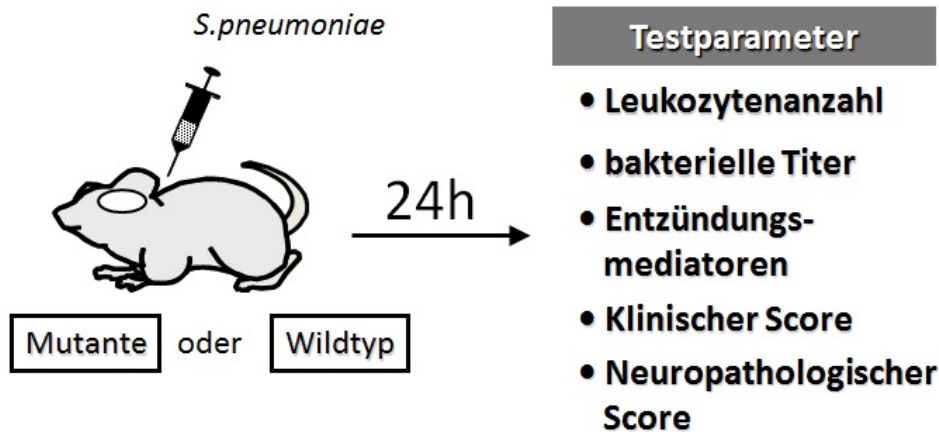
#### 2.3.2.2 Versuchsdurchführung

Nach der klinischen Evaluation wurden die Mäuse mit Isofluran (3,5%-ig) narkotisiert. Während der Narkose wurden  $10^5$  Kolonien-bildende Einheiten (KBE) *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39 Stamm) mit einer Insulinspritze transkutan in die Zisterna magna injiziert.

Der weitere Verlauf unterschied sich je nach Versuchsserie/Versuchsmodell:

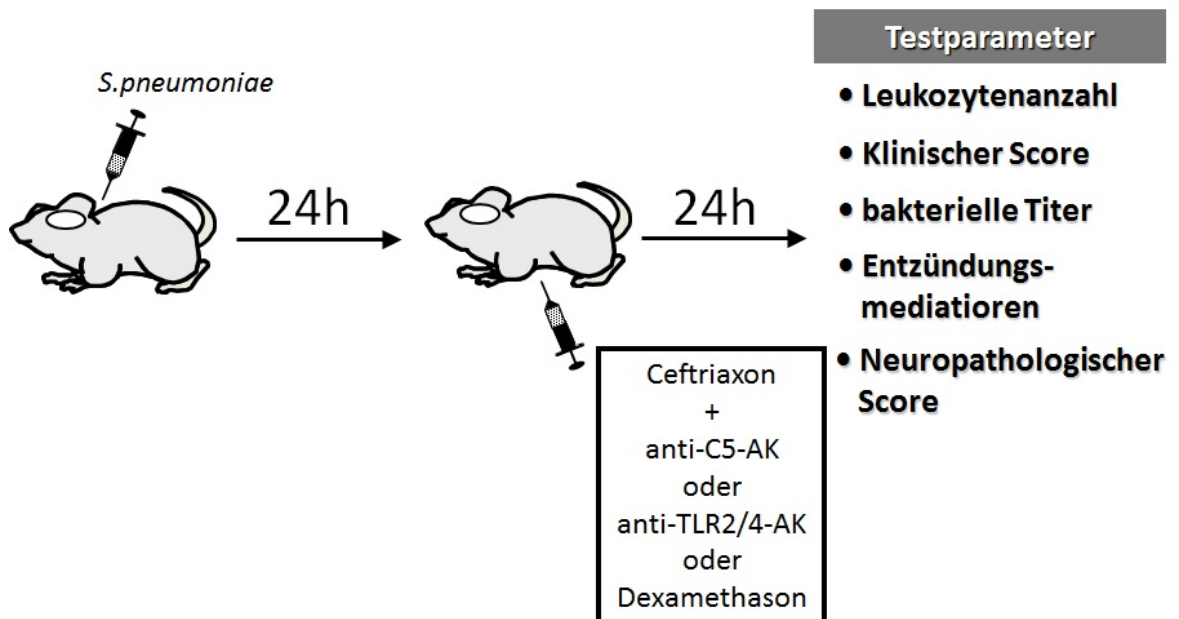
- Im sogenannten Akutmodell, das ohne antimikrobielle Behandlung erfolgte, wurden Unterschiede im „Spontanverlauf“ der Pneumokokken-Meningitis zwischen Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen erfasst. Nach einer Infektionsdauer von 24 Stunden wurden die in der Abbildung 5 aufgelisteten Testparameter (genaue Beschreibung siehe unter Punkt 3.2.3.7) bestimmt. In gleicher Weise wurde auch die Wirksamkeit von neutralisierenden Antikörpern gegen C5 [BB5.1] (1 mg/Maus) und Toll-like Rezeptoren 2 [T2.5] und 4 [15C1] (jeweils 0,75 mg/Maus) getestet. Dabei wurden die Antikörper direkt nach Infektion mit Pneumokokken intraperitoneal injiziert.

Abb. 5: 24h-Infektionsversuch



- Die Wirksamkeit adjuvanter Therapiemaßnahmen wurde im klinischen Modell (2) der Pneumokokken-Meningitis überprüft. In diesem Modell wurden die Mäuse 24 Stunden nach Infektion klinisch evaluiert und im Anschluss intraperitoneal mit 100 mg/kg Ceftriaxon (in 0,5 ml PBS gelöst) in Kombination mit dem adjuvanten Arzneimittel behandelt. Als solche wurden anti-C5-Antikörper [BB5.1] (1 mg/Maus), anti-TLR2/4-AK [T2.5 und 1A6] (je 0,75 mg/Maus) und Dexamethason (0,5 mg/kg Körpergewicht) eingesetzt. Kontroll-Mäusen wurden entweder Maus-IgG (1,5 mg/Maus) oder PBS (250 µl/Maus), das „Vehikel“ von Dexamethason, zusammen mit dem Antibiotikum appliziert. Vierundzwanzig Stunden nach Behandlungsbeginn (48 Stunden nach Infektion) erfolgte die Untersuchung der Mäuse entsprechend der Abbildung 6.

Abb. 6: 48h-Therapieversuch





Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion (Akutmodell) bzw. Therapie (kliniknahes Modell) wurden die Mäuse erneut klinisch untersucht (wie oben beschrieben). Daraufhin wurden die Versuchstiere mit einer intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 10 mg/kg KG Xylazin narkotisiert und im Anschluss der Schädel in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Nach subkutaner Applikation einer 1%-igen Lidocainlösung über der Okzipitalschuppe wurde diese freipräpariert und ein Loch rostral des Okzipitalpoles in Verlängerung der Sutura sagitalis gebohrt. Durch diese Öffnung wurde mittels eines Katheters Liquor cerebrospinalis aus der Zisterna magna gewonnen. Für die darauffolgende Messung des intrakraniellen Drucks wurde ein zweiter Katheter, der an einen Druckwandler angeschlossen war, in das Bohrloch eingeführt und mit chirurgischem Gewebekleber mit dem Knochen luftdicht verklebt. Zum Ausgleich des vorher entnommenen Liquors wurde 10 µl PBS in die Zisterna magna gespritzt und nach einer Minute der Mitteldruck abgelesen. Im nächsten Schritt eröffnete man den Brustkorb der Maus und entnahm mit einer Insulinspritze aus dem rechten Ventrikel Blut, das zur Bluttitrierbestimmung und zur Serumgewinnung verwendet wurde. Um die Blutgefäße des Hirns zu leeren, führte man in die linke Herzkammer einen Schlauch ein und perfundierte das Gefäßsystem mit 15 ml kalter, heparinierter PBS-Lösung (inklusive 10 Einheiten Heparin pro ml PBS), wobei das Blut-PBS-Gemisch über zuvor gesetzte Schnitte in der Leber abfließen konnte. Nach durchgeführter Perfusion konnte das Hirn der Maus entnommen werden. Das Großhirn konservierte man entweder bei -80°C oder fixierte es in Formalin, während das Kleinhirn in 1ml sterilem PBS homogenisiert wurde.

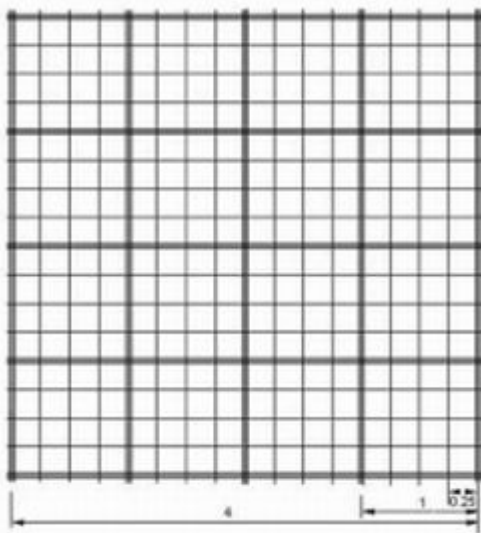
#### 2.3.2.3 Bestimmung der bakteriellen Titer

Zur Bestimmung der bakteriellen Titer im Hirn wurde das Kleinhirnhomogenat sequentiell mit PBS verdünnt und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Für den Bluttitrier wurden 10 µl des gewonnenen Blutes sequentiell mit PBS verdünnt und ebenfalls auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C unter anaeroben Verhältnissen wurde die Zahl der Kolonien-bildenden Einheiten (KBE) von *Streptococcus pneumoniae* bestimmt.

#### 2.3.2.4 Leukozytenzellzahl im Liquor

Der gewonnene Liquor cerebrospinalis wurde zur Bestimmung der Leukozytenzellzahl verwendet. Hierbei wurden 2  $\mu\text{l}$  Liquor in 18  $\mu\text{l}$  Türk'sche Lösung gegeben und mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Abb. 7) die Leukozytenzellzahl unter dem Mikroskop ermittelt. Dabei wird die Zahl der Leukozyten, die sich innerhalb von 4 x 4 Quadraten befinden, mit dem Verdünnungsfaktor des Untersuchungsmaterials (in dieser Untersuchung: x 10) multipliziert und anschließend durch das Messvolumen (= ausgewertete Fläche mal Kammertiefe = 0,2  $\text{mm}^3$ ) dividiert.

Abb. 7: Fuchs-Rosenthal-Zählkammer



Anmerkung: Die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde zur Bestimmung der Anzahl von Leukozyten im Liquor verwendet. Die Größe des Rasters ist 4x4 Millimeter; die Gesamtfläche beträgt damit 16  $\text{mm}^2$  (0,0625  $\text{mm}^2$  pro Kästchen), die Tiefe 0,2 mm und das maximal fassbare Volumen 3,2  $\mu\text{l}$ .

#### 2.3.2.5 Quantifizierung von Einblutungen und Messung des Ventrikelvolumens

Das gefrorene Großhirn wurde mit einem CryoCutter (Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) nach einem definierten Protokoll geschnitten. Man fertigte zunächst 30  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte, um von rostraler Seite her den Anfang der Liquorräume aufzusuchen. An dieser Position beginnend wurden in der Folge mit einer Kodak-Digitalkamera zehn Schnittflächen im Abstand von jeweils 300  $\mu\text{m}$  (das entspricht 10 x 30  $\mu\text{m}$  Schnitte) fotografiert. Die Fotoaufnahmen wurden auf einem PC gespeichert und mit Hilfe der

Software „ImageToll UTHSCSA“ ausgewertet. Bei dieser Auswertung wurden die sichtbaren Einblutungen gezählt und deren Fläche ermittelt. Zudem wurde die Fläche der Liquorräume bestimmt. Das ungefähre Ventrikelvolumen berechnete man schließlich aus dem Produkt der Summe der Ventrikelflächen auf den zehn Bildern und deren Abstand, nämlich 0,3 mm.

Die anfallenden Hirnschnitte wurden in drei Eppendorfgläsern gesammelt und später für Proteinanalysen (siehe 3.2.8.) verwendet. Im Bereich des Mittelhirns wurden zudem sechs 10 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.3.2.6 Immunhistochemische Bestimmung von Komplementfaktoren

Die in Formalin fixierten Großhirne wurden in Paraffin eingebettet und für immunhistochemische Untersuchungen herangezogen (mit freundlicher Unterstützung von Frau Angelika Henn, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU, München, Deutschland), um die in vivo Expression von C5a und terminalem Komplementkomplex darzustellen (siehe auch Kastenbauer et al., 2002). Zuerst wurden hierzu 5 µm dicke Hirnschnitte deparaffiniert, rehydriert und deren Antigene demaskiert, indem man sie in 10 mmol/L Zitrat-Puffer (pH 6) in einem Mikrowellengerät für zwei bis drei Minuten erhitzte. Die endogenen Peroxidasen wurden daraufhin durch eine fünfminütige Inkubation in 7,5%-iger Wasserstoffperoxidlösung gehemmt. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Hirnschnitte mit 10% Ziegen Serum für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Hirnschnitte mit einer Lösung überschichtet und über Nacht bei 4° inkubiert, die anti-Maus-C5a bzw. anti-TCC (terminaler Komplement Komplex)-Antikörper (jeweils in einer 1:250 Verdünnung der Ausgangslösung) als primäre Antikörper enthielt. Als sekundärer Antikörper fungierten Biotin-konjugierte anti-Ratten- bzw. anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege. Die im nächsten Schritt hinzugeführte Streptavidin-markierte Meerrettichperoxidase (Vectastain ABC Kit) bindet an den biotinylierten sekundären Antikörper und wandelt die hinzugegebene 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (Vector Laboratories) in einen unlöslichen braunen Farbstoff um. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Mayers Hämatoxylin. Die gefärbten Hirnschnitte wurden anschließend mit einer Videokamera (Motivam 5000) aufgenommen, die an einem Olympus BX51-LM

Lichtmikroskop angebracht und mit der PC Bildverarbeitungssoftware Motic Images Advanced 3.2 verbunden war.

### 2.3.2.7 Das neuropathologische Scoresystem

Entscheidend für den Verlauf einer Pneumokokken-Meningitis sind vor allem intrakranielle Komplikationen, die durch die überschießende Immunantwort verursacht werden. Wichtige intrakranielle Komplikationen sind intrazerebrale Einblutungen und eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. Ein neuropathologisches Scoresystem wurde zur semiquantitativen Beurteilung dieser pathologischen Veränderungen im Gehirn entwickelt. Die Blut-Hirn-Schranken-Störung wurde dabei mit Hilfe eines Albumin-ELISA erfasst (Beschreibung siehe unter Punkt 3.2.8). Da Albumin nur außerhalb des Gehirns gebildet wird, ist der Nachweis von Albumin ein Hinweis auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität. Je durchlässiger die Bluthirnschranke ist, umso mehr Albumin ist im Gehirn nachweisbar. Die Zuordnung von Scorewerten zur gemessenen Albuminmenge ist in der Tabelle 2 dargestellt. Die Anzahl der intrazerebralen Blutungen wurde in zehn koronaren Hirnschnitten (wie unter 3.2.5. beschrieben) ausgezählt. Der Tabelle 2 ist ebenfalls die Zuordnung von Scorewerten zur Blutungsanzahl zu entnehmen. Bildet man nun die Summe aus den ermittelten Werten für die Einblutungsanzahl und den Albumingehalt, erhält man den neuropathologischen Score.

Tab. 2: Neuropathologisches Scoresystem

Intracerebrale Blutungen		Störung der Blut-Hirn-Schranke	
Anzahl	Score	Albumin [ng/μg]	Score
0	0	0-35	0
1 – 20	1	36-70	1
21 – 60	2	71 – 140	2
> 60	3	> 140	3

### 2.3.2.8 Quantitative Analyse von C5a, C5b-C9, Maus-CXCL1, -IL-1 $\beta$ , -sL-Selektin, -IL-6 und -Albumin mittels ELISA

Die ELISA-Untersuchungen wurden an Hirnhomogenaten der Maus durchgeführt. Das Hirnhomogenat wurde aus Kryoschnitten hergestellt (siehe 3.2.5.), die bei -80 °C aufbewahrt worden waren. Um eine Degradierung der Proteine zu verhindern, wurden die Proben mit 450  $\mu$ l einer Pufferlösung (EMSA A) und proteolysehemmenden Enzymen versehen, nämlich 1  $\mu$ l einer Aprotinin-Lösung mit 22,3 U/ml, 2  $\mu$ l Leupeptin-Lösung (Konzentration 50mg/ml), 20  $\mu$ l einer Pepstatin A-Lösung (Konzentration 1mg/ml) und 10  $\mu$ l PMSF (0,797g/ml). Eine anschließende Ultraschallbehandlung (5 mal 10 Sekunden im Ultraschallbad) erlaubte die Homogenisierung der Kryoschnitte. In der Folge wurden durch eine zehnminütige Zentrifugation (mit  $13,2 \times 10^2$  rpm; Runden pro Minute) Gewebefragmente von der Proteinsuspension (Überstand) abgetrennt und letztere als Probe für die hier aufgeführten ELISAs verwendet.

Folgende ELISA-Kits wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt:

- C5a und C5b-C9-ELISA (Uscn Life Science Inc.) mit 10  $\mu$ l Probe + 90  $\mu$ l PBS
- Maus-CXCL1/KC-ELISA (R&D Systems) mit 50  $\mu$ l Probe
- IL-1 $\beta$ -ELISA (R&D Systems) mit 50  $\mu$ l Probe
- sL-Selektin-ELISA (R&D Systems) mit 50  $\mu$ l Probe
- IL-6-ELISA (R&D Systems) mit 50  $\mu$ l Probe
- Maus CXCL2/MIP-2 (R&D; Systems) mit 50  $\mu$ l Probe

Der Albumin-ELISA wurde, wie folgt, selbst angefertigt:

Zunächst erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte (96-Vertiefungen (Wells)) mit primärem anti-Maus-Albumin-Antikörper. Hierfür wurden je 100  $\mu$ l einer Lösung in die Wells pipettiert, die sich aus 5 ml einer 0,05 molaren Karbonat-Bikarbonatlösung (pH = 9,6), und 50  $\mu$ l anti-Maus-Albumin-Antikörper zusammensetzte. Danach wurde die Platte dreimal mit je 200  $\mu$ l/well Waschpuffer gewaschen, der aus 1 l destilliertem Wasser, 4,44 g Trizma® HCl, 2,65 g Trizma® Base und 500  $\mu$ l Tween 20 bestand. Im nächsten Schritt wurden 20 ml eines Puffers aus 1 l destilliertem Wasser, 4,44 g Trizma® HCl und 2,65 g Trizma® Base mit 200 mg bovinem Albumin (BSA) gemischt und davon 200  $\mu$ l/well als Lösung zur Verhinderung unspezifischer Bindungen („Blocken“) bei Raumtemperatur in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht; nach zweiminütiger Einwirkzeit wurde diese Lösung entfernt und die Vertiefungen erneut mit je 200  $\mu$ l des Waschpuffers

gewaschen. Nun folgte die Applikation der Eichreihe und der Proben (jeweils 100 µl/Well), wobei immer Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die Eichreihe stellte eine Verdünnungsreihe aus bekannten Konzentrationen von Albumin eines Maus-Referenz-Serums (1000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, etc. bis 3,9 ng/ml) dar, das mit 100 µl einer Lösung aus 30 ml Waschpuffer und 300 mg BSA verdünnt worden war. Als Proben dienten die Proteinsuspensionen, die – wie oben beschrieben - aus Hirnhomogenaten gewonnen worden waren und in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen eingesetzt wurden: zum einen wurden 10 µl Probe mit 90 µl EMSA A pro Well, zum anderen 5 µl Probe mit 95 µl EMSA A pro Well gemischt. Nach einstündiger Inkubation und einem weiteren Waschdurchgang (fünfmal 200 µl Waschpuffer/Well) wurde ein primärer Antikörper (100 µl einer Lösung, die sich aus 1 µl mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem anti-Maus-Albumin-Antikörper der Ziege und 10 ml Beschichtungspuffer zusammensetzte) in die Wells eingebracht. Nach abermals einstündiger Inkubation und erneutem fünfmaligen Waschen gab man je 100 µl einer 1:1-Mischung der Farbreaktoren A und B (R&D Systems) in die Wells. Fünfzehn Minuten später wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stopp-Lösung (100 µl pro Well), bestehend aus 9 ml destilliertem Wasser und 3 ml Schwefelsäure, abgebrochen. Im Anschluss wurde die Absorption mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Multimodal Readers bei 450 nm (mit einer Referenzwellenlänge bei 570 nm) gemessen.

Die im ELISA ermittelten Albumin- und Zytokinkonzentrationen wurden jeweils auf das Gesamtprotein in der jeweiligen Messprobe bezogen, um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten. Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden jeweils 5 µl der jeweiligen Proteinsuspension mit einer standardisierten Menge an Nanoquantlösung (gemäß Angaben des Herstellers: Carl Roth GmbH & Co KG) gemischt und die optische Dichte der jeweiligen Probe mittels eines Photometers (Ultraspec 500/1100 pro; Amersham, BD Biosciences) bei 450 nm und 590 nm bestimmt. Dem Quotienten dieser Messwerte konnte dann anhand einer vorher angefertigten Eichkurve eine bestimmte Gesamtproteinkonzentration zugeordnet werden.

#### 2.3.2.8 Statistische Analyse der Ergebnisse

Die Zusammenhänge zwischen Komplementfaktor-Konzentrationen und klinischen Parametern bei Patienten mit Pneumokokken-Meningitis wurden mittels einer

Korrelationsanalyse nach Spearman erfasst und Signifikanzen mittels Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) errechnet. Die Ergebnisse des Maus-Modells wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Beim Vergleich multipler Versuchsgruppen/Hypothesen wurde eine alpha-Korrektur nach Bonferroni-Holm durchgeführt. Dabei wird der alpha-Wert durch die Anzahl der Vergleichsgruppen  $n$  weniger 1 geteilt, d.h.  $0,05/(n-1)$ .

Die Überlebenszeit wurde mit dem Log-Rank-Test (Mantel-Haenszel-Test) analysiert.

Alle Daten, bei denen sich ein p-Wert  $< 0,05$  ergab, wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expressionsanalyse

##### 3.1.1 Komplementfaktoren C3a, C5a und C5b-C9 bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis

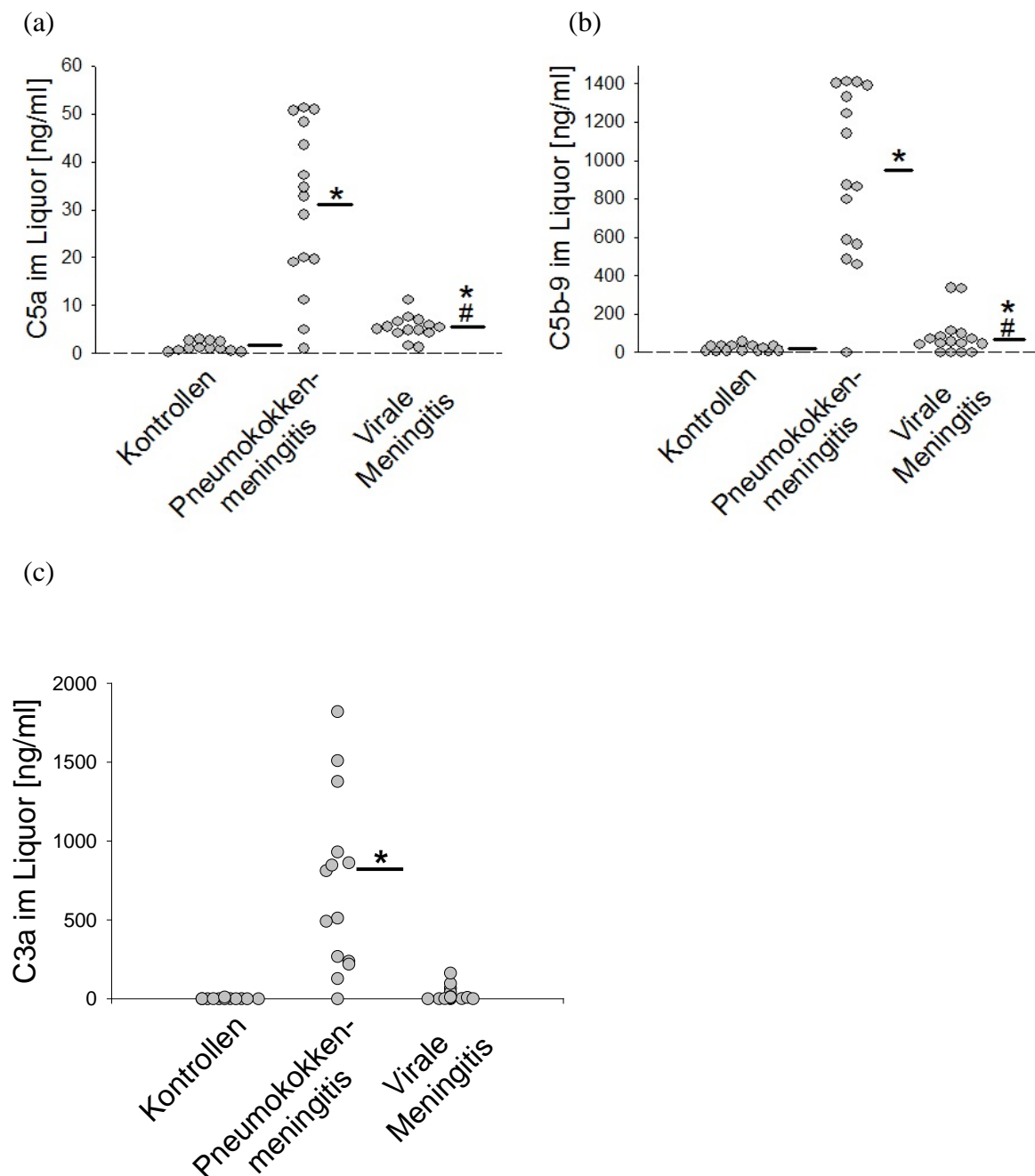
Um einen ersten Einblick in eine mögliche Rolle der Anaphylatoxine C3a und C5a sowie des löslichen terminalen Komplementfaktors bei der Pneumokokken-Meningitis zu erhalten, wurden zunächst die Konzentrationen dieser Faktoren in Liquorproben von Patienten mit (1) einer Pneumokokken-Meningitis, (2) einer viralen Meningitis und (3) nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen (Kontroll-Patienten) bestimmt. Eine anschließende Korrelationsanalyse zwischen diesen Faktoren und verschiedenen klinischen Messgrößen sollte erste Hinweise auf eine mögliche klinische Bedeutung terminaler Komplementfaktoren bei dieser Erkrankung liefern.

##### 3.1.1.1 C3a, C5a und C5b-C9- Konzentrationen in Liquorproben von Patienten mit Meningitis

Die Konzentrationen der Komplementkomponenten C3a, C5a und C5b-9 waren in Liquorproben von Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis signifikant höher als bei Kontrollpatienten und bei Patienten mit einer viralen Meningitis. Bei Patienten mit einer viralen Meningitis lagen die Liquor-Konzentrationen von C5a und C5b-9 (nicht aber für C3a) geringfügig, aber signifikant über denen der Kontrollpatienten (Abb. 8 a-c).



Abb. 8 a-c: Nachweis von Komplementfaktoren im Liquor von Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis



Legende: Kontrollen: n = 12 in den Abbildungen a und c; n = 15 in Abbildung b (Liquor reichte bei 3 Patienten nicht für die Analyse von C3a und C5a aus); Pneumokokken-Meningitis: n = 15 bei allen Untersuchungen; virale Meningitis (a): n = 14 in den Abbildungen a und c; n = 16 in Abbildung b (Liquor reichte bei 2 Patienten nicht für die Analyse von C3a und C5a aus); \*  $p < 0,0001$  im Vergleich zu Kontrollpatienten; #  $p < 0,001$  im Vergleich zu Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis

### 3.1.1.2 Korrelationsanalyse zwischen Liquor-Komplement-Konzentrationen und klinischen Parametern bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis

Bei den Korrelationsanalysen testeten wir, ob zwischen den Konzentrationen der jeweiligen Komplementfaktoren und klinischen Krankheitsskalen (Glasgow-Koma-Skala und Glasgow-Outcome-Skala) sowie verschiedenen Liquorparametern (Leukozytenanzahl, Glukose, Protein, sowie Liquor-/Serum-Albumin-Quotient) ein statistischer Zusammenhang bestand.

Bei den Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis wurde aufgrund einer Störung der Blut-Hirnschrankenfunktion eine Erhöhung des Liquor/Serum-Albumin-Quotienten beobachtet. Gleichzeitig ging die Blut-Hirnschrankenstörung mit einem Anstieg des Gesamtproteingehalts im Liquor einher. In der Korrelationsmatrix spiegelt sich dieser Zusammenhang in einer stark positiven Korrelation von Albumin-Quotient und Gesamtprotein wieder ( $r = 0,974$ ;  $p < 0,001$ ). Die ebenfalls positive Korrelation von C5a und C5b-C9 ( $p < 0,01$ ) lässt sich dadurch erklären, dass in der Komplementkaskade bei der Spaltung von C5 zu gleichen Teilen C5a und C5b gebildet wird. Die genannten beiden Korrelationen sprechen für die Validität und Reliabilität unserer Korrelationsanalyse.

Am auffälligsten ist die signifikante negative Korrelation von C5a und C5b-C9 (nicht aber C3a) mit dem Wert der Glasgow-Koma-Skala. Diese stellt eine einfache Skala zur Abschätzung einer Bewusstseinsstörung dar. Die maximale Punktzahl beträgt 15 und entspricht vollem Bewusstsein; die minimale Punktzahl von 3 spricht für ein tiefes Koma. Die negative Korrelation deutet somit darauf hin, dass hohe C5a- bzw. C5b-C9-Spiegel im Liquor mit einem schlechten klinischen Zustand bei Aufnahme einhergehen.

Des Weiteren fanden wir eine signifikante positive Korrelation zwischen C5b-C9 und der Liquor-Leukozytenzahl. Patienten mit hohen C5a-Spiegeln im Liquor wiesen in unserer Analyse lediglich eine Tendenz zu hohen Leukozytenzahlen auf (Korrelationskoeffizient nach Spearman,  $r = 0,65$ ,  $p = 0,069$ ). In einer Folgeuntersuchung, die wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. van de Beek (Universität Amsterdam) an einer wesentlich größeren Patientenkohorte ( $n = 204$ ) durchführten, fand sich jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen C5a-Spiegeln und Leukozytenzahlen im Liquor (Woehrl et al., 2011).

Tab. 3: Korrelationsmatrix nach Spearman zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den Liquor-Konzentrationen von C3a, C5a sowie C5b-C9 einerseits und klinischem Status und Liquor-Parameter andererseits bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis

	WBC	PROTEIN	GLUKOSE	GCS	GOS	C3a	C5a	C5b-C9	ALBU
WBC	1								
PROTEIN	0,583	1							
GLUKOSE	-0,218	-0,478	1						
GCS	-0,481	-0,581	<b>0,743 *</b>	1					
GOS	0,081	-0,337	0,473	0,453	1				
C3a	0,542	0,695	-0,462	-0,483	-0,480	1			
C5a	0,67	0,649	-0,545	<b>-0,791 *</b>	-0,068	0,699	1		
C5b-C9	<b>0,814 *</b>	<b>0,703 *</b>	-0,638	<b>-0,813 *</b>	-0,068	0,570	<b>0,877 **</b>	1	
ALBU	0,579	<b>0,974 ***</b>	-0,441	-0,594	-0,413	<b>0,754</b>	0,667	0,648	1
	*	p<0,04							
	**	p<0,01							
	***	p<0,001							

Legende: WBC: Leukozytenzahl im Liquor; PROTEIN: Gesamtproteingehalt im Liquor; GLUKOSE: Glukosekonzentration im Liquor; GCS: Glasgow-Koma-Skala; GOS: Glasgow-Outcome-Skala; ALBU: Albumin-Quotient Liquor/Serum; Signifikanzen: \* p < 0,04; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

Kurz zusammengefasst deuten die Befunde unserer Expressions- und Korrelationsanalyse bei Patienten mit Pneumokokken-Meningitis auf eine potentielle Beteiligung von C5a und C5b-9 in der Pathophysiologie der Erkrankung hin.

Zur genaueren Charakterisierung der Funktion dieser Faktoren führten wir im Folgenden Versuche in unserem etablierten Mausmodell durch: Zunächst überprüften wir, ob die Befunde bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis im Mausmodell nachvollzogen werden können. Im Anschluss wurde der Krankheitsphänotyp verschiedener transgener Mäusestämme, die beispielsweise genetische Defizienzen von Anaphylatoxinen aufwiesen, in diesem Modell bestimmt.

### 3.1.2 Zeitliches und räumliches Expressionsprofil der Komplementfaktoren C5a und C5b-C9 im Mausmodell

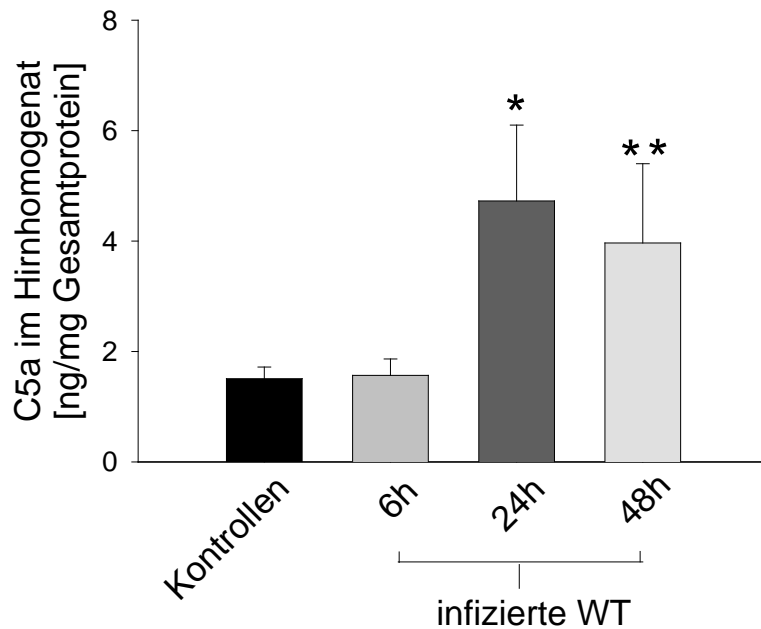
Um zu überprüfen, ob die bei Patienten beobachteten Expressionsveränderungen von C5a und C5b-C9 im Mausmodell nachvollzogen werden können, analysierten wir die Expression dieser Faktoren im Hirngewebe infizierter Wildtypmäuse mittels ELISA und Immunhistochemie. Als Kontrollgruppe wurden Wildtypmäuse verwendet, denen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung intrathekal injiziert worden war.

Die ELISA-Experimente zeigten eine signifikante Erhöhung von C5a und C5b-C9-Konzentrationen im Hirnhomogenat infizierter Wildtypmäuse sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden (nicht aber 6 Stunden) nach der Infektion (Abb. 9).

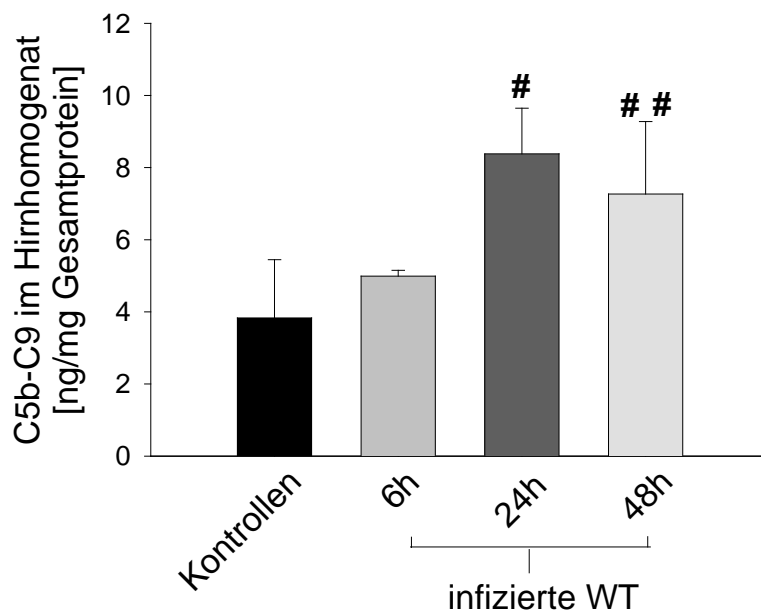
In immunhistochemischen Untersuchungen wurde daraufhin das räumliche Expressionsprofil von C5a und C5b-C9 analysiert. Hierfür wurden Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Hirne infizierter Wildtypmäuse verwendet. Zur Darstellung der Präsenz dieser Komplementfaktoren wurden die Hirnschnitte mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Anfärbung mit Antikörper gegen C5a und C5b-C9 führte zu einem ähnlichen Färbemuster: positive Signale fanden sich ausnahmslos im leukozytären Infiltrat und im Bereich leptomeningealer und kortikaler Gefäße (Abb. 10).

Abb. 9: C5a- (a) und C5b-C9- (b) Proteinkonzentrationen im Hirnhomogenat von Kontrollen und infizierten Wildtyp-Mäusen im Verlauf einer experimentellen Pneumokokken-Meningitis

(a)

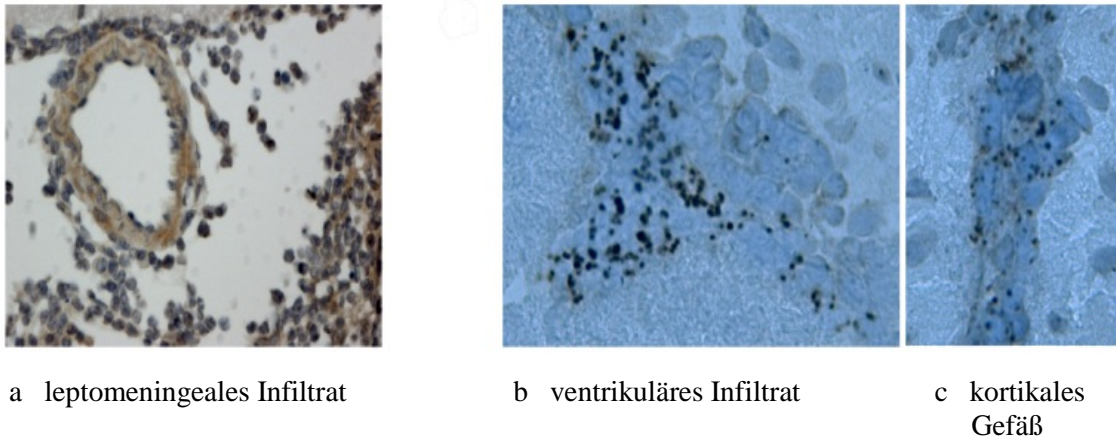


(b)



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; Kontrollen: n = 3; infizierte WT (Wildtyp-Mäuse) 6h nach Infektion: n = 4; infizierte WT 24h nach Infektion: n = 4; infizierte WT 48h nach Infektion: n=5. \* p=0,006, C5a-Spiegel 24h nach Infektion im Vergleich zu Kontrollen; \*\* p=0,014, C5a-Spiegel 48h nach Infektion im Vergleich zu Kontrollen; # p=0,002, C5b-C9-Spiegel 24h nach Infektion im Vergleich zu Kontrollen; ## p=0,016, C5b-C9-Spiegel 48h nach Infektion im Vergleich zu Kontrollen;

Abb. 10: Immunhistochemische Darstellung von C5a und C5b-C9 in Hirnschnitten Pneumokokken-infizierter Mäuse 24 Stunden nach der Infektion



Vergrößerung: a x400, b und c x1000

Diese Untersuchungen verdeutlichen somit, dass C5a und C5b-C9, analog zu den Ergebnissen bei Patienten mit Pneumokokken-Meningitis, auch im Mausmodell vermehrt exprimiert werden.

### 3.2 Funktionsanalyse der Komplementfaktoren C3a, C5a und C5b-C9 im Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis

Im Folgenden wurde der Einfluss der Komplementfaktoren C3a, C5a und des terminalen Komplementkomplexes C5b-C9 in einem etablierten Mausmodell mit transgenen Mäusestämmen evaluiert. Dabei wurden C3a-Rezeptor- und CD59a-defiziente Mäuse sowie Mäuse, deren C6 durch eine Spontanmutation funktionslos war, mit entsprechenden Wildtyp-Mäusen in einem 24h-Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis verglichen. Anschließend erfolgte die Untersuchung von C5a-Rezeptor-defizienten Mäusen.

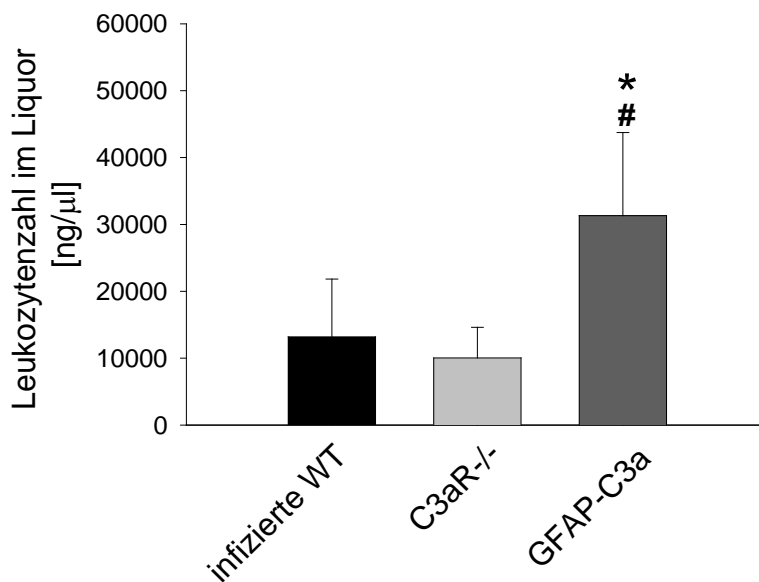
#### 3.2.1 Die Rolle von C3a im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis

Das Anaphylatoxin C3a kann vielfältige, teilweise sogar gegensätzliche Wirkungen entfalten. Zum einen kann C3a die Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und TNF- $\alpha$  (Fischer et al., 1997) steigern, auf Granulozyten und Makrophagen chemotaktisch

wirken und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch Phagozyten induzieren (Elsner et al., 1994; Gasque, 2004; Hawlisch et al., 2004; Skattum et al., 2011). Zum anderen wurden inhibitorische Effekte von C3a auf die Freisetzung von IL-6 und TNF- $\alpha$  durch B-Lymphozyten (Fischer et al., 1997) sowie die Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  durch nicht-adhärenente Monozyten beschrieben (Takabayashi et al., 1996). Um die Rolle von C3a bei der Pneumokokken-Meningitis zu evaluieren, wurden im sogenannten Akutmodell (siehe Abschnitt 2.3.2.2) Mäuse eingesetzt, denen entweder der Rezeptor für C3a fehlte (C3aR<sup>-/-</sup>) oder die C3a im Zentralnervensystem unter der Kontrolle des Astrozytenproteins GFAP überexprimierten (GFAP-C3a).

Die Überexpression von C3a im Zentralnervensystem führte zu einer signifikanten Zunahme der Meningitis-induzierten Liquorpleozytose, während die genetische Defizienz von C3a keine Auswirkungen auf die Leukozyteneinwanderung in den Liquorraum hatte (Abb. 11).

Abb. 11: Vergleich der Leukozytenzahlen im Liquor bei Wildtyp-Mäusen, C3a-Rezeptor-defizienten und GFAP-C3a-Mäusen (GFAP-C3a)



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 12); C3aR<sup>-/-</sup> = C3a-Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 12); GFAP-C3a = Mäuse, die im ZNS C3a überexprimieren (n = 11); \* p=0,003, WT versus GFAP-C3a; # p=0,001, C3aR<sup>-/-</sup> versus GFAP-C3a.

Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Bestimmung der Hirn-Konzentrationen des Zytokins IL-1 $\beta$ , das als wichtiger Aktivator der Immunreaktion bei der Pneumokokken-Meningitis

fungiert (Hoegen et al., 2011; Klein et al., 2006b; Zwijnenburg et al., 2003): die IL-1 $\beta$ -Spiegel waren im Hirnhomogenat von GFAP-C3a-Mäusen signifikant höher als in dem von Wildtyp-Mäusen, während sich die C3aR-defizienten Tiere in diesem Punkt nicht von den Wildtyp-Tieren unterschieden. Keine Unterschiede zwischen den drei Mäusestämmen fanden sich hingegen in der Expression des Zytokins IL-6 und des Neutrophilen-Chemokins CXCL2 (Tab. 4).

Die Analysen der bakteriellen Konzentrationen im Hirnhomogenat und Blut lieferten keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten transgenen Mäusen und infizierten Wildtyp-Mäusen (Tab. 5).

Tab. 4: Zytokin-Konzentrationen im Hirnhomogenat infizierter Wildtyp-Mäuse, C3a-Rezeptor-defizienter sowie GFAP-C3a-Mäuse 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion

	infizierte WT	C3aR <sup>-/-</sup>	GFAP-C3a
<b>IL-1<math>\beta</math> [pg/mg]</b>	29,54 $\pm$ 12,90	21,91 $\pm$ 1,10	60,82 $\pm$ 5,80 *
<b>IL-6 [pg/mg]</b>	112,41 $\pm$ 49,80	94,72 $\pm$ 31,22	94,76 $\pm$ 83,39
<b>CXCL2 [pg/mg]</b>	177,66 $\pm$ 33,50	145,85 $\pm$ 113,15	101,56 $\pm$ 76,30

Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 12); C3aR<sup>-/-</sup> = C3a-Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 12); GFAP-C3a = Mäuse, die im ZNS C3a überexprimieren (n = 11); IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; IL-6: Interleukin 6; CXCL2: C-X-C-Motiv Chemokin Ligand-2; \* p=0,011, GFAP-C3a Mäuse im Vergleich zu C3aR<sup>-/-</sup>.

Tab. 5: Bakteriellies Wachstum im Kleinhirnhomogenat und Blut infizierter Wildtyp-Mäuse, C3a-Rezeptor-defizienter sowie GFAP-C3a Mäuse 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion

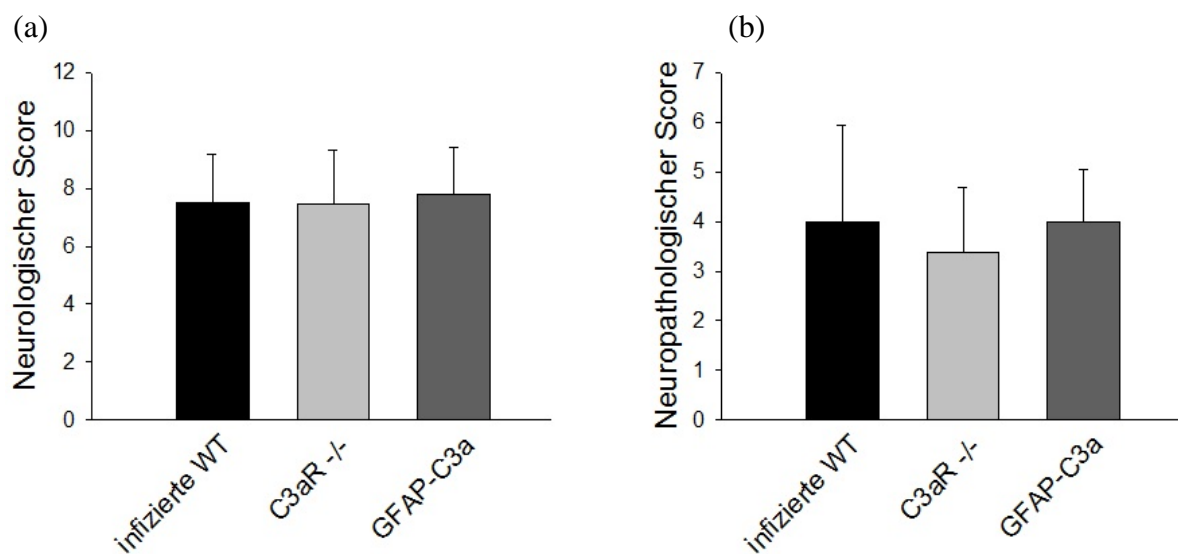
	infizierte WT	C3aR <sup>-/-</sup>	GFAP-C3a
<b>Kleinhirn</b> <b>[log<sub>10</sub> KBE/Organ]</b>	6,84 $\pm$ 0,46	6,73 $\pm$ 0,78	6,82 $\pm$ 0,62
<b>Blut</b> <b>[log<sub>10</sub> KBE/ml]</b>	3,94 $\pm$ 1,41	4,61 $\pm$ 1,43	3,59 $\pm$ 1,04

Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 12); C3aR<sup>-/-</sup> = C3a-Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 12); GFAP-C3a = Mäuse, die im ZNS C3a überexprimieren (n = 11). log<sub>10</sub> KBE = dekadischer Logarithmus der Kolonien-bildenden Einheiten.



Die bei den GFAP-C3a-Mäusen beobachtete ausgeprägte Liquorpleozytose und IL-1 $\beta$ -Expression ging mit keiner signifikanten Veränderung im klinischen und neuropathologischen Score einher. Auch die C3aR-defizienten Mäuse wiesen keinerlei Unterschiede hinsichtlich dieser beiden Scoresysteme zu den infizierten Wildtyp-Mäusen auf (Abb. 12 a und b).

Abb. 12: Klinischer (a) und Neuropathologischer (b) Score infizierter Wildtyp-Mäuse, C3a-Rezeptor-defizienter sowie GFAP-C3a-Mäuse 24 Stunden nach Induktion der Pneumokokken-Meningitis



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 12); C3aR<sup>-/-</sup> = C3a-Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 12); GFAP-C3a = Mäuse, die im ZNS C3a überexprimieren (n = 11).

Kurz zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Versuche vermuten, dass das Anaphylatoxin C3a keine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis einnimmt.

### 3.2.2 Untersuchung zur Funktion des terminalen Komplementkomplexes an Mäusen mit einer Funktionsverlust-Mutation im C6-Gen sowie an CD59a-defizienten Mäusen

Der terminale Komplementkomplex wird aus den Komplementfaktoren C5b-C9 gebildet. Er führt membrangebunden als Membran-Angriffs-Komplex zur Lyse Gram-negativer

Bakterien, wie zum Beispiel von *Neisseria meningitidis* (Frank et al., 1987). In seiner löslichen Form (sTCC: löslicher terminaler Komplementkomplex) kann er pro-inflammatorische und chemotaktische Effekte vermitteln (Casarsa et al., 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass sTCC die Gefäßpermeabilität erhöhen (Bossi et al., 2004) und nach einem Schädel-Hirn-Trauma zum Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke beitragen kann (Stahel et al., 2001). Das Protein CD59a ist ein endogener Inhibitor des terminalen Komplementkomplexes. Es verhindert die Bindung von C9 an C5b-C8 (Meri et al., 1990). Um die pathophysiologische Rolle des TCC näher zu ergründen, wurden folgende Mäusestämme im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis (siehe Abschnitt 2.3.2.2) analysiert: (1) Mäuse mit einer Mutation im C6-Gen ( $C6^{\text{mutant}}$ ), die keinen funktionsfähigen TCC bilden können, (2) CD59a-defiziente Mäuse ( $CD59a^{-/-}$ ), bei denen die endogene Hemmung der C5b-C9-Bildung entfällt, sowie (3) entsprechende Wildtypkontrollen.

Vierundzwanzig Stunden nach Infektion wiesen Mäuse mit einer Funktionsverlust-Mutation des C6-Gens tendenziell niedrigere Leukozytenzahlen ( $p = 0,197$ ) im Liquor als infizierte Wildtyp-Mäuse auf. Im Gegensatz dazu waren die Leukozytenzahlen bei infizierten CD59a-defizienten Tieren signifikant höher als in der Wildtypgruppe (Abb. 13).

Keinerlei Unterschiede fanden sich zwischen den transgenen Mäusestämmen und den Wildtyp-Mäusen hinsichtlich der Hirn-Konzentrationen der Entzündungsmediatoren IL-1 $\beta$ , IL-6 und CXCL2 (Tab. 6).

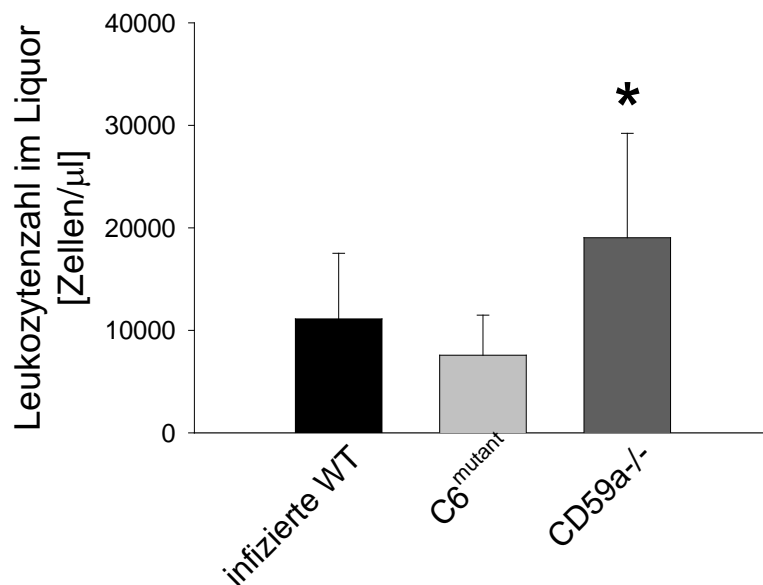
Tab. 6: Zytokin-Konzentrationen im Hirnhomogenat infizierter Wildtyp-Mäuse, von Funktionsverlustmutanten des C6 Gens sowie CD59a-defizienter Mäuse 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion

	<b>infizierte WT</b>	<b><math>C6^{\text{mutant}}</math></b>	<b><math>CD59a^{-/-}</math></b>
<b>IL-1<math>\beta</math> [pg/mg]</b>	37,4 $\pm$ 30,5	40,2 $\pm$ 6,7	27,7 $\pm$ 6,1
<b>IL- 6 [pg/mg]</b>	108,5 $\pm$ 35,5	106,5 $\pm$ 61,5	143,4 $\pm$ 38,6
<b>CXCL-2 [pg/mg]</b>	97,5 $\pm$ 9,7	66,5 $\pm$ 39,7	122,7 $\pm$ 55,1

Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 20);  $C6^{\text{mutant}}$  = Funktionsverlustmutanten des C6-Gens (n = 14);  $CD59a^{-/-}$  = CD59a-defiziente Mäuse (n = 11); IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; IL-6: Interleukin 6; CXCL2: C-X-C-Motiv Chemokin Ligand-2

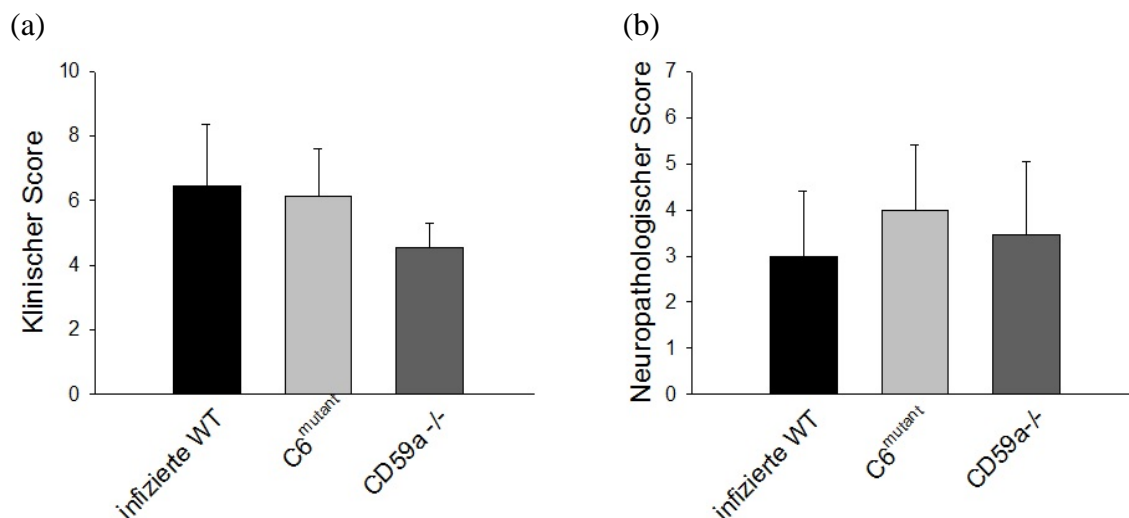
Es ließen sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den transgenen Mäusestämmen und den Wildtyp-Mäusen hinsichtlich der neurologischen und neuropathologischen Veränderungen feststellen (Abb. 14).

Abb. 13: Leukozytenzahl im Liquor infizierter Wildtyp-Mäuse, von Funktionsverlustmutanten des C6-Gens sowie CD59a-defizienten Mäusen 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 20); C6<sup>mutant</sup> = Funktionsverlustmutanten des C6-Gens (n = 14); CD59a<sup>-/-</sup> = CD59a-defiziente Mäuse (n = 11); \* p=0,007, im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Mäusen.

Abb. 14: Klinischer (a) und neuropathologischer (b) Score infizierter Wildtyp-Mäuse, von Funktionsverlustmutanten des C6-Gens sowie CD59a-defizienten Mäusen 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 20); C6<sup>mutant</sup> = Funktionsverlustmutanten des C6-Gens (n = 14); CD59a<sup>-/-</sup> = CD59a-defiziente Mäuse (n = 11).

Die Analysen der bakteriellen Konzentrationen im Hirnhomogenat und Blut lieferten keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten transgenen Mäusen und infizierten Wildtyp-Mäusen (Tab. 7).

Tab. 7: Bakteriellles Wachstum im Kleinhirnhomogenat und Blut infizierter Wildtyp-Mäuse, von Funktionsverlustmutanten des C6-Gens sowie CD59a-defizienten Mäusen 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion

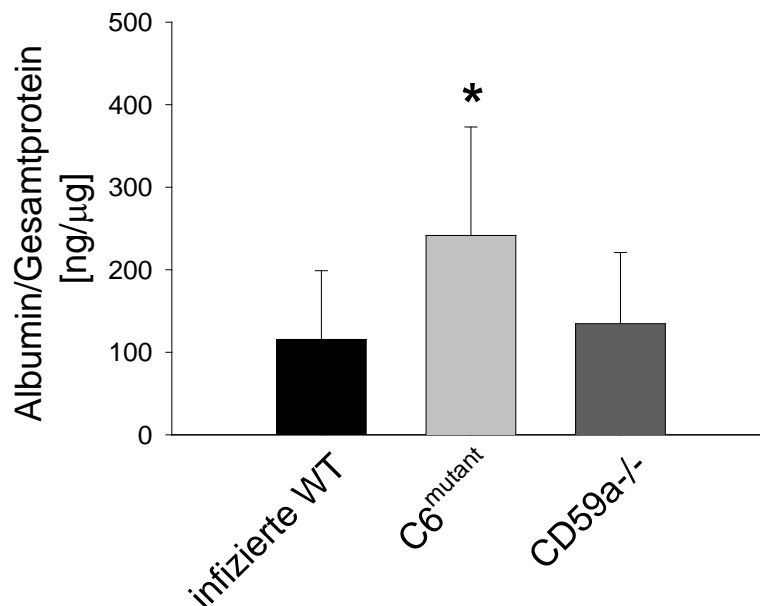
	infizierte WT	C6 <sup>mutant</sup>	CD59a <sup>-/-</sup>
<b>Kleinhirn</b> [log <sub>10</sub> KBE/Organ]	6,59 ± 0,46	7,05 ± 0,53	6,38 ± 0,70
<b>Blut</b> [log <sub>10</sub> KBE/ml]	3,48 ± 0,91	4,00 ± 0,99	3,90 ± 1,25

Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 12); C3aR<sup>-/-</sup> = C3a-Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 12); GFAP-C3a = Mäuse, die im ZNS C3a überexprimieren (n = 11). log<sub>10</sub> KBE = dekadischer Logarithmus der Kolonien-bildende Einheiten.

Auffällig war jedoch, dass Funktionsverlustmutanten des C6 Gens eine erhöhte Sterblichkeitsrate im Vergleich zu den Wildtyp- und CD59a-defizienten Mäusen aufwiesen (50% [7 von 14] bei C6<sup>mutant</sup> vs. 10% [2 von 20] bei WT vs. 18% [2 von 11] bei CD59a<sup>-/-</sup>). Eine mögliche Erklärung lieferten Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke: Bei der Messung der Albumin-Konzentrationen im Hirnhomogenat beobachteten wir signifikant höhere Werte bei den C6<sup>mutant</sup>-Mäusen als bei infizierten Wildtyp-Mäusen (Abb 15). Da sich CD59a-defiziente Mäuse hinsichtlich der Albumin-Spiegel nicht von Wildtyp-Mäusen unterschieden, scheint dieser Phänotyp nicht durch die Komplementdefizienz bedingt zu sein, sondern auf andere Mutations-assoziierte Unterschiede zu beruhen.

Kurz zusammengefasst sprechen diese Befunde gegen eine entzündungsverstärkende Funktion des terminalen Komplementkomplexes bei der experimentellen Pneumokokken-Meningitis.

Abb.15: Auswirkungen der CD59a-Defizienz und C6-Mutation auf die Hirn-Albuminkonzentration 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 20); C6<sup>mutant</sup> = Funktionsverlustmutanten des C6-Gens (n = 14); CD59a<sup>-/-</sup> = CD59a-defiziente Mäuse (n = 11); \* p = 0,023, im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Mäusen.

### 3.2.3 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung des Anaphylatoxins C5a bei der experimentellen Pneumokokken-Meningitis

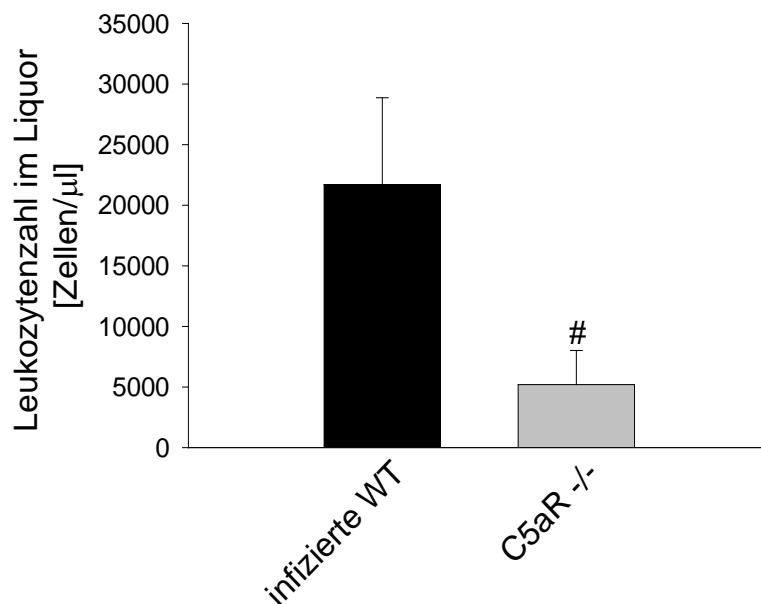
C5a ist ein potentes Anaphylatoxin: Es hat eine direkte chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, auf Monozyten und Makrophagen (Guo et al., 2005; Haas et al., 2007; Marder et al., 1985). Zudem kann C5a die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, steigern (Gasque, 2004; Ricklin et al., 2010; Skattum et al., 2011; Strieter et al., 1992). Aufgrund dieser Eigenschaften ist C5a ein vielversprechendes Kandidatenmolekül für die Regulation der Entzündungsreaktion bei der Pneumokokken-Meningitis. Zur Klärung dieser Hypothese wurden in unserem Akutmodell transgene Mäuse verwendet, die keinen funktionalen C5a-Rezeptor exprimieren (C5aR<sup>-/-</sup>, C5aR-Defizienz). Da die C5aR<sup>-/-</sup>-Mäuse einen genetischen BALB/c-Hintergrund aufwiesen, wurden in dieser Versuchsreihe BALB/c-Mäuse als Wildtyp-Kontrollen verwendet.

Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion fanden wir bei Mäusen, denen der Rezeptor für C5a fehlte, eine deutliche Reduktion der Liquorpleozytose, um ca. 75% im Vergleich

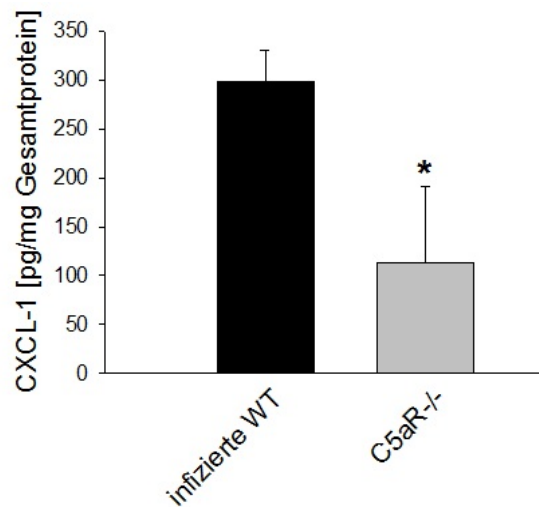
zu Wildtyp-Mäusen. Diese Reduktion ging mit signifikant geringeren Hirn-Konzentrationen der Neutrophilen-Chemokine CXCL1 und CXCL2 bei den C5aR<sup>-/-</sup>-Mäusen einher. Die Hirn-Konzentrationen des Zytokins IL-6 war bei den C5aR<sup>-/-</sup>-Mäusen tendenziell niedriger als bei entsprechenden Wildtyp-Mäusen ( $p = 0,081$ ). Die Hirn-Konzentrationen von IL-1 $\beta$  waren in beiden Mäusestämmen annähernd gleich (Abb. 16 a-e).

Abb. 16: Auswirkung der C5aR-Defizienz auf die Leukozytenzahl und die Zytokin-Konzentrationen 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion

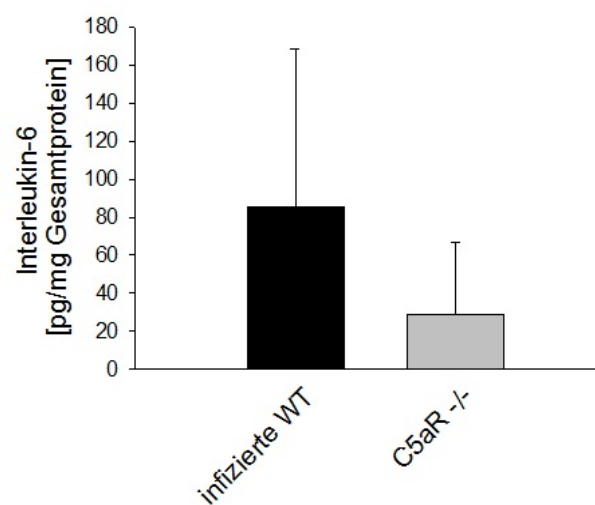
(a)

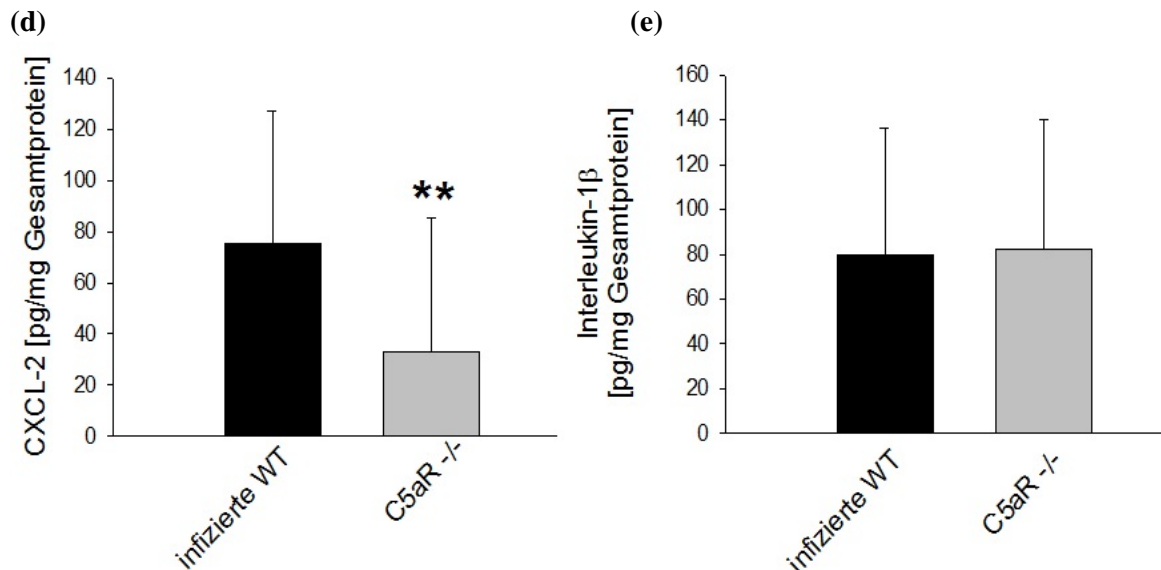


(b)



(c)



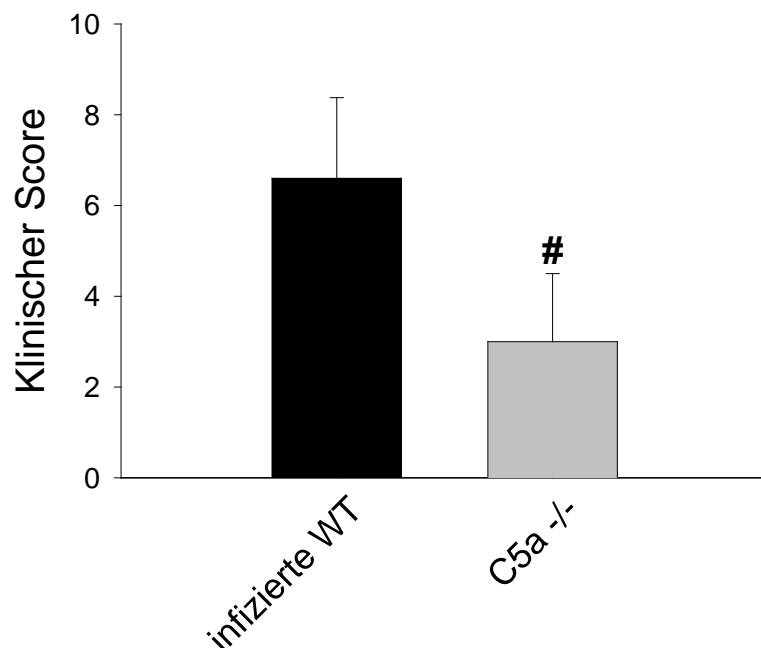


Legende: Mäuse-Stamm: BALB/c; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 10); C5aR<sup>-/-</sup> = C5a-Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 9); CXCL-1/2 = C-X-C-Motiv Chemokin Ligand-1/2; (a) # p = 0,0001 C5aR<sup>-/-</sup> vs. infizierte WT; (b) \* p = 0,019 infizierte WT zu C5aR<sup>-/-</sup>; (d) \*\* p = 0,038 C5aR<sup>-/-</sup> vs. infizierte Wildtyp-Mäuse.

Die weniger stark ausgeprägte Entzündungsreaktion bei C5aR<sup>-/-</sup>-Mäusen wirkte sich positiv auf den klinischen Verlauf der Pneumokokken-Meningitis aus. Dies spiegelte sich sowohl in einem niedrigeren klinischen Score der transgenen Tiere (Abbildung 17) als auch in einer weniger ausgeprägten Hypothermie, einem geringeren Gewichtsverlust sowie einer höheren motorischen Aktivität wieder (Tab. 8).

Die Bestimmungen der bakteriellen Titer im Kleinhirnhomogenat und Blut zeigten, dass die C5aR-Defizienz keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum hat (C5aR<sup>-/-</sup> =  $6,15 \pm 0,73 \log_{10}$  KBE /Kleinhirn vs. WT:  $6,58 \pm 0,59 \log_{10}$  KBE /Kleinhirn; C5aR<sup>-/-</sup> =  $2,47 \pm 1,30 \log_{10}$  KBE im Blut vs. WT  $3,71 \pm 1,19 \log_{10}$  KBE im Blut).

Abb. 17: Klinischer Score der Mäuse bei C5aR-Defizienz



Legende: Mäuse-Stamm: BALB/c; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 10); C5aR<sup>-/-</sup> = C5a Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 9); # p=0,0002, C5aR<sup>-/-</sup> im Vergleich zu infizierten WT.

Tab. 8: Auswirkung der C5aR-Defizienz auf die Meningitis-assoziierte Hypothermie, Gewichtsreduktion und Abnahme der motorischen Aktivität

	infizierte WT	C5aR <sup>-/-</sup>
Hypothermie [°C]	36,6 ± 0,54	37,33 ± 0,40 *
Gewichtsverlust [%]	-13,27 ± 2,38	-11,12 ± 1,49 **
OFT [Anzahl der Felder / 2 min]	3 ± 4,32	23,33 ± 20,73 ***

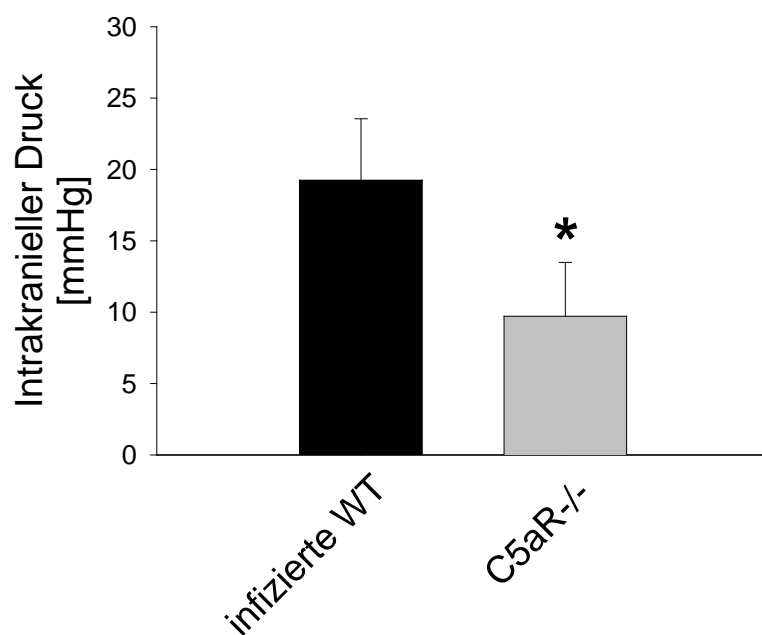
Legende: Mäuse-Stamm: BALB/c; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 10); C5aR<sup>-/-</sup> = C5a-Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 9); OFT: Open Field Test; \* p = 0,004, \*\* p = 0,031, \*\*\* p = 0,007 bei Vergleich von infizierten Wildtyp-Mäusen mit infizierten C5aR<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Ursächlich für den günstigeren klinischen Verlauf dürften weniger stark ausgeprägte intrakranielle Komplikationen und/oder neuropathologische Veränderungen sein. So waren bei den C5aR-defizienten Mäusen die intrakraniellen Druckwerte (Abb. 18a) signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen. Ferner lagen die neuropathologischen Scorewerte bei den Gen-defizienten Mäusen signifikant unter denen der Wildtyp-Mäuse. (Abb. 18b)

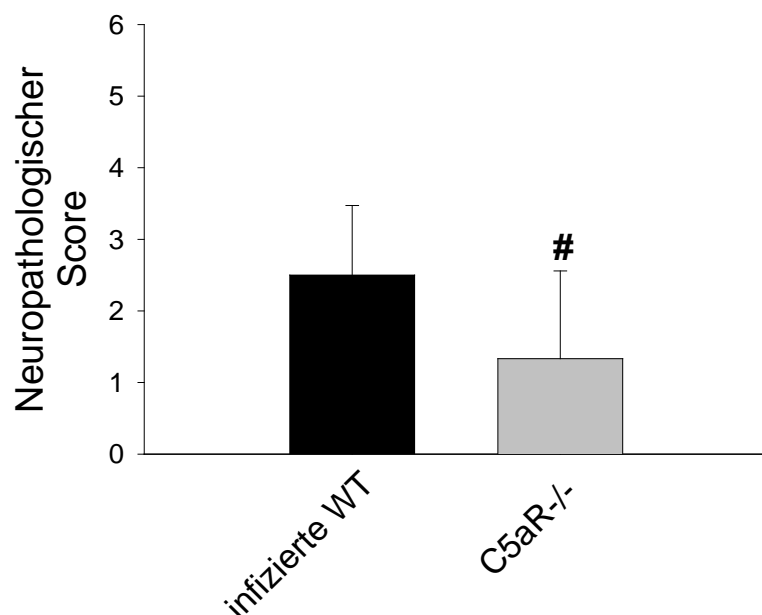


Abb. 18: Auswirkung der C5aR-Defizienz auf Meningitis-assoziierte intrakranielle Veränderungen

(a)



(b)



Legende: Mäuse-Stamm: BALB/c; WT = Wildtyp-Mäuse (n = 10); C5aR<sup>-/-</sup> = C5a Rezeptor-defiziente Mäuse (n = 9); (a) \* p=0,0006, C5aR<sup>-/-</sup> im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Mäusen; (b) # p=0,034, im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Mäusen.

Zusammenfassend sprechen unsere Befunde für eine fundamentale Rolle von C5a in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis. Da die genetische Defizienz von C5aR die Immunreaktion supprimierte und den klinischen Verlauf verbesserte, ohne aber

die Infektabwehr zu schwächen, könnte die Ausschaltung von C5a mittels neutralisierender Antikörper eine vielversprechende adjuvante Therapiemaßnahme bei der Pneumokokken-Meningitis sein.

### 3.3 Experimentelle Untersuchungen zu möglichen neuen adjuvanten Therapiemaßnahmen bei der Pneumokokken-Meningitis

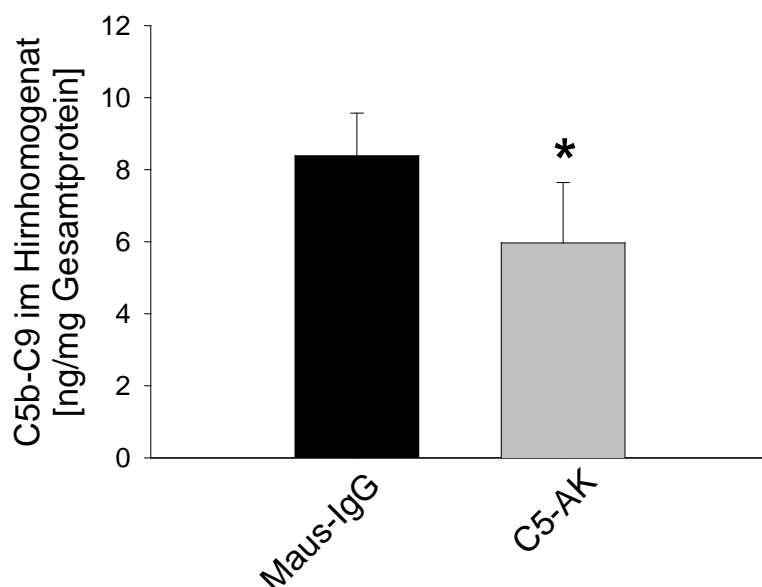
#### 3.3.1 Untersuchungen zur Wirksamkeit von Antikörpern, die entweder gegen C5 oder gegen die Toll-Like-Rezeptoren 2 und 4 gerichtet sind, im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis

##### 3.3.1.1 Effektivität und Wirkung von anti-C5-Antikörpern

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von anti-C5-AK bei der Pneumokokken-Meningitis wurden zunächst Untersuchungen im Akutmodell durchgeführt. In dieser Versuchsreihe wurde der anti-C5-AK BB5.1 (C5-AK) in einer Dosierung von 1 mg/Maus (entsprechend den Angaben früherer Untersuchungen von De Vries et al., 2003 und Huugen et al., 2007) unmittelbar vor der intrazisternalen Pneumokokken-Infektion intraperitoneal verabreicht und dessen Wirkung auf die Bildung des terminalen Komplementkomplexes, die Liquorpleozytose und den klinischen Score erfasst. Als Vergleichsgruppe dienten Mäuse, denen direkt vor der Infektion Maus-IgG intraperitoneal appliziert wurde (Maus-IgG). Die Neutralisation von C5 führte zu einer signifikant verminderten Bildung von terminalem Komplementkomplex im Hirn infizierter Wildtyp-Mäuse 24 Stunden nach der Infektion (Abb. 19).

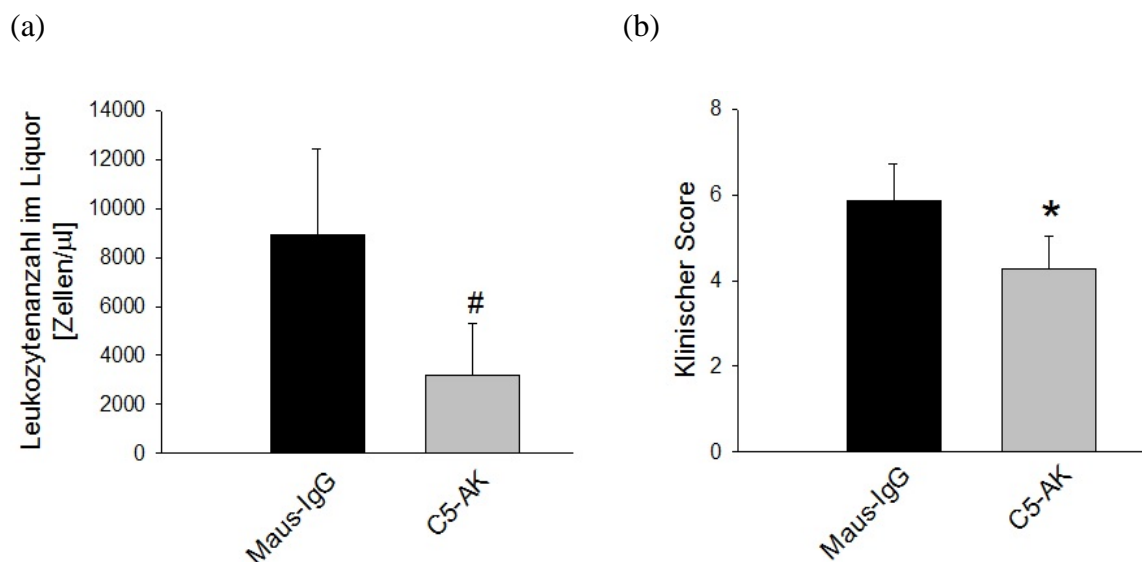
Des Weiteren wiesen Mäuse, die mit dem anti-C5-Antikörper vorbehandelt worden waren, signifikant niedrigere Leukozytenzahlen im Liquor als die mit Kontrollantikörpern behandelten Tiere auf (Abb. 20 a). Überdies war bei den anti-C5-AK behandelten Mäusen die Krankheitssymptomatik geringer ausgeprägt als in der Vergleichsgruppe, was sich in niedrigeren klinischen Score-Werten widerspiegelte (Abb. 20 b).

Abb. 19: Auswirkung einer Vorbehandlung mit anti-C5-Antikörpern auf die Bildung von terminalem Komplementkomplex im Hirn infizierter Mäuse



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; Maus-IgG = mit murinem Immunglobulin G-behandelte Mäuse (n = 12); C5-AK = mit murinen anti-C5-Antikörpern behandelte Mäuse (n = 7); p=0,012; Bei gesunden Kontroll-Mäusen lag die Hirn-C5b-C9-Konzentration bei  $3,8 \pm 1,6$  ng/mg Gesamtprotein

Abb. 20: Auswirkungen der Vorbehandlung mit anti-C5-Antikörpern auf die Liquor-Leukozytenzahl (a) und den klinischen Score (b)



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; Maus-IgG = mit murinem Immunglobulin G-behandelte, infizierte Mäuse (n = 12); C5-AK = mit murinem anti-C5-Antikörper-behandelte, infizierte Mäuse (n = 7); (a) # p = 0,003 Therapie mit C5-AK versus Maus-IgG ; (b) \* p = 0,002 C5-AK versus Maus-IgG;

Vergleicht man den Phänotyp der mit anti-C5-AK-behandelten Mäuse mit dem der C5a Rezeptor-defizienten Mäuse, so fällt deren Ähnlichkeit auf. Diese Übereinstimmung spricht für die Wirksamkeit des Antikörpers in unserem Modell.

### 3.3.1.2 Untersuchungen zur Wirksamkeit von anti-TLR2/4-Antikörpern im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis

In früheren Untersuchungen hatte unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Mustererkennungsrezeptoren TLR2 und 4 entscheidend zur Immunaktivierung und zur MyD88-abhängigen Aktivierung des Komplementsystems beitragen (Klein et al., 2008). Daher erschien die Blockade dieser Rezeptoren eine weitere vielversprechende Option für die adjuvante Therapie der Pneumokokken-Meningitis zu sein.

Zunächst testeten wir die Wirksamkeit von anti-TLR2 und TLR4-Antikörpern im Akutmodell der Pneumokokken-Meningitis. Dabei wurde den Versuchstieren unmittelbar nach der Pneumokokken-Infektion ein Gemisch aus anti-TLR2 und TLR4-Antikörpern (TLR-2/4-AK; jeweils 0.75mg/Maus) intraperitoneal injiziert. Kontrolltiere erhielten stattdessen Maus-IgG in gleicher Dosierung (1.5 mg/Maus)

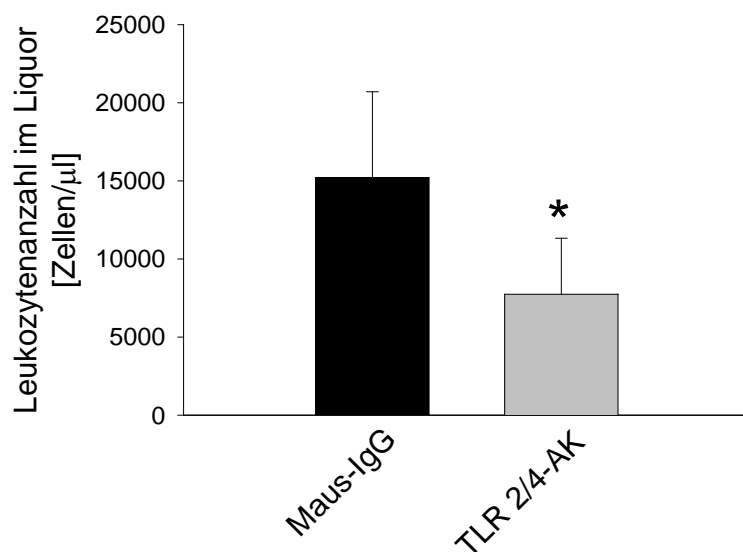
Die Behandlung mit anti-TLR-2/4-AK bewirkte eine signifikante Abnahme der Liquorpleozytose. Dieser anti-inflammatorische Effekt ging mit einer Reduktion der neuropathologischer Veränderungen, nicht aber mit einem niedrigeren klinischen Score einher (Abb. 21 a, b, c). Grund dafür ist vermutlich die mit der Antikörpertherapie verbundene höhere Bakterienlast (bakterieller Titer im Kleinhirn:  $7,01 \pm 0,32 \log_{10}$  KBE/Organ bei den anti-TLR-2/4-behandelten Mäusen und  $6,00 \pm 0,38 \log_{10}$  KBE/Organ bei den Kontroll-Mäusen,  $p = 0,002$ ; bakterielle Titer im Blut:  $4,46 \pm 0,49 \log_{10}$  KBE/Organ bei den anti-TLR-2/4-behandelten Mäusen und  $3,42 \pm 0,52 \log_{10}$  KBE/Organ bei den Kontroll-Mäusen,  $p = 0,012$ ), die wiederum zu einer Zunahme systemischer Komplikationen führen könnte.

Die Auswirkungen der anti-TLR2 und TLR4-Antikörper-Therapie auf den Krankheitsverlauf der experimentellen Pneumokokken-Meningitis entsprachen denen der genetischen Doppeldefizienz von TLR2 und TLR4. Dies spricht für die Wirksamkeit der Antikörperbehandlung in unserem Modell. Die negative Wirkung dieser

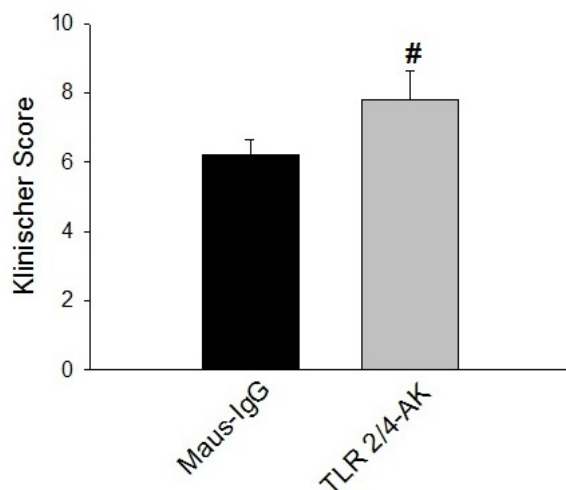
Antikörperbehandlung auf die Infektabwehr kann vermutlich durch gleichzeitige Gabe eines Antibiotikums vermieden werden. Somit erschien uns die Gabe dieser Antikörper eine weitere Option für eine selektive, anti-inflammatorische Behandlungsmaßnahme bei der Pneumokokken-Meningitis zu sein.

Abb. 21: : Auswirkungen der Vorbehandlung mit anti-TLR2/4-Antikörpern auf die Liquor-Leukozytenzahl (a) und den neuropathologischen Score (b)

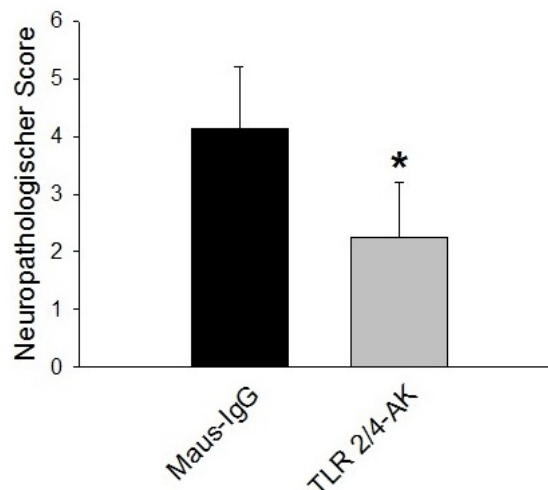
(a)



(b)



(c)



Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; Kontrollen (n = 12); Maus-IgG = mit murinem Immunglobulin G-behandelte Mäuse (n = 5); TLR2/4-AK = mit anti-Toll-like Rezeptor 2/4-Antikörper-behandelte Mäuse (n = 5); (a) \* p = 0,039, im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen; (b) # p = 0,009 im Vergleich zu IgG behandelten Mäusen; (c) \* p = 0,047;

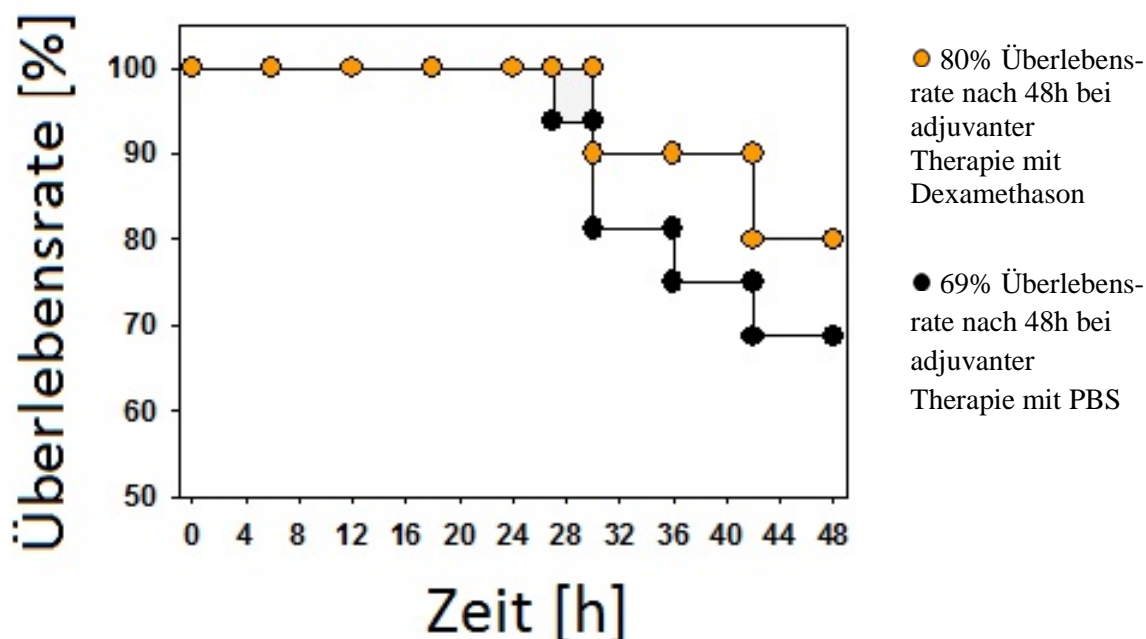
### 3.3.2 Untersuchungen zu neuen adjuvanten Behandlungsmaßnahmen bei der Pneumokokken-Meningitis

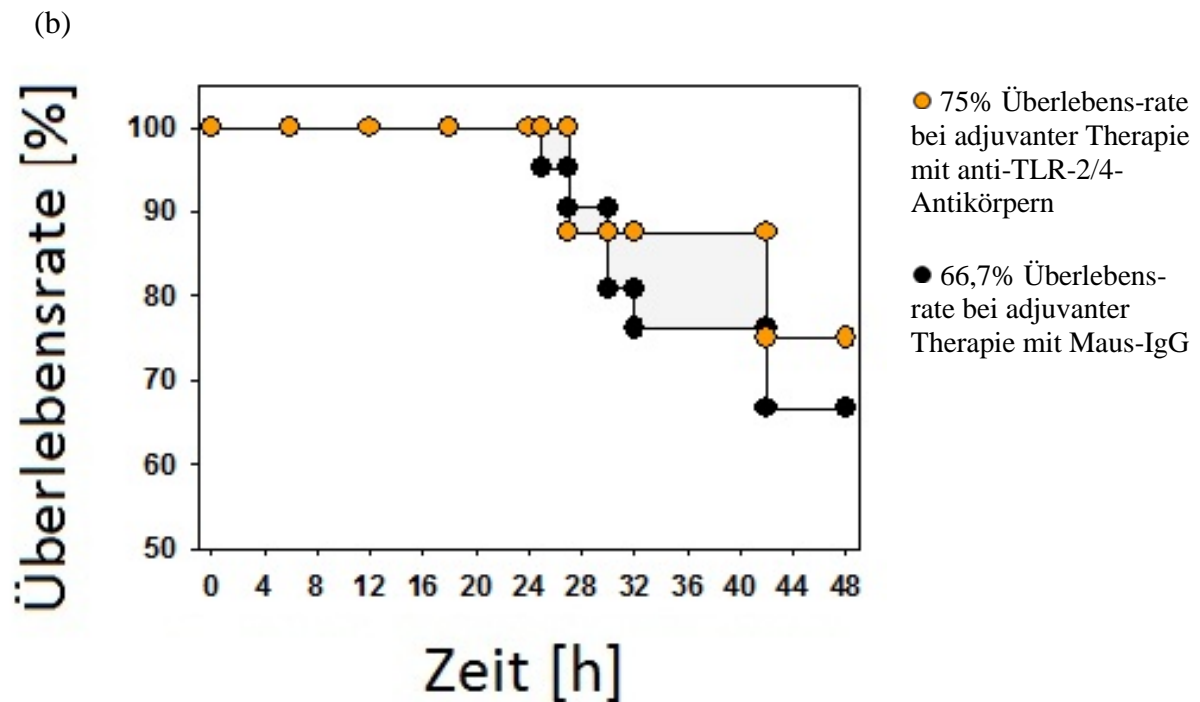
In einer abschließenden Versuchsreihe verglichen wir die Wirksamkeit des C5-Antikörpers mit der von [i] neutralisierenden Antikörpern gegen TLR 2 und 4 sowie von [ii] Dexamethason. Wie schon erwähnt, gelten TLR2 und TLR4 als entscheidende Mustererkennungsrezeptoren bei der Induktion der Immunreaktion bei der Pneumokokken-Meningitis (Klein et al., 2008). Dexamethason wiederum ist derzeit das einzige immunsuppressive Medikament, für das ein protektiver Effekt auf den Verlauf einer Pneumokokken-Meningitis im Erwachsenenalter berichtet wurde (Brouwer et al., 2010a; de Gans et al., 2002; Tyler, 2008). Als Vergleichsgruppen dienten im Falle der Dexamethason-Untersuchungen PBS-behandelte Mäuse, bei den Antikörper-Untersuchungen - analog zu den Studien im Akutmodell - Maus-IgG-behandelte Mäuse.

In unserem Modell konnte weder durch die Dexamethason-Gabe noch durch die Applikation von anti-TLR2/4-Antikörpern die Sterblichkeitsrate signifikant reduziert werden (Abbildung 22 a und b).

Abb. 22: Auswirkungen adjuvanter Therapiemaßnahmen auf die Überlebensrate im klinischen Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis

(a)

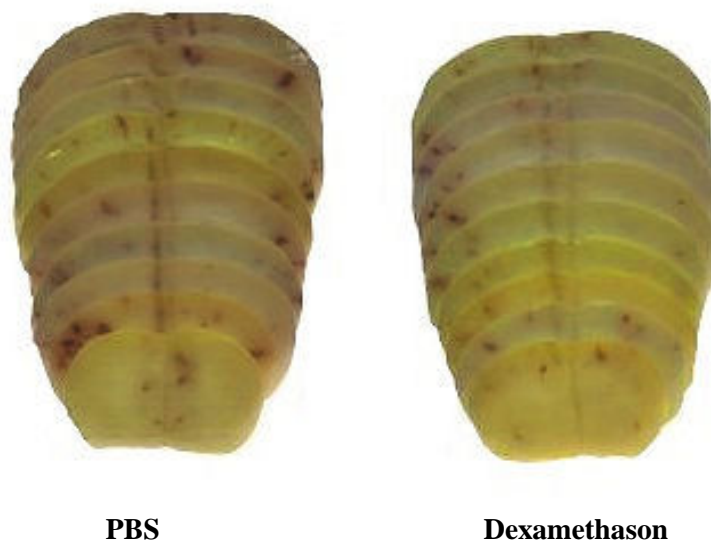




Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; PBS = mit Phosphat gepufferte Salzlösung behandelte Mäuse (n = 16); Dexamethason-behandelte Mäuse (n=10); mit Maus-IgG-behandelte Mäuse (n = 21); mit anti-TLR-2 und 4-behandelte Mäuse (n = 8).

Auch auf die Entstehung neuropathologischer Veränderungen konnten wir keinen signifikanten Effekt dieser Behandlungsmaßnahmen feststellen. In Abbildung 23 wird die Ausprägung intrazerebraler Blutungen nach Behandlung mit PBS, Dexamethason, Maus-IgG und anti-TLR-2/4-Antikörper am Beispiel repräsentativer Hirnbilder veranschaulicht.

Abb. 23: Auswirkung adjuvanter Therapiemaßnahmen mit Dexamethason und anti-TLR2/4-AK auf die Anzahl an kortikalen Einblutungen



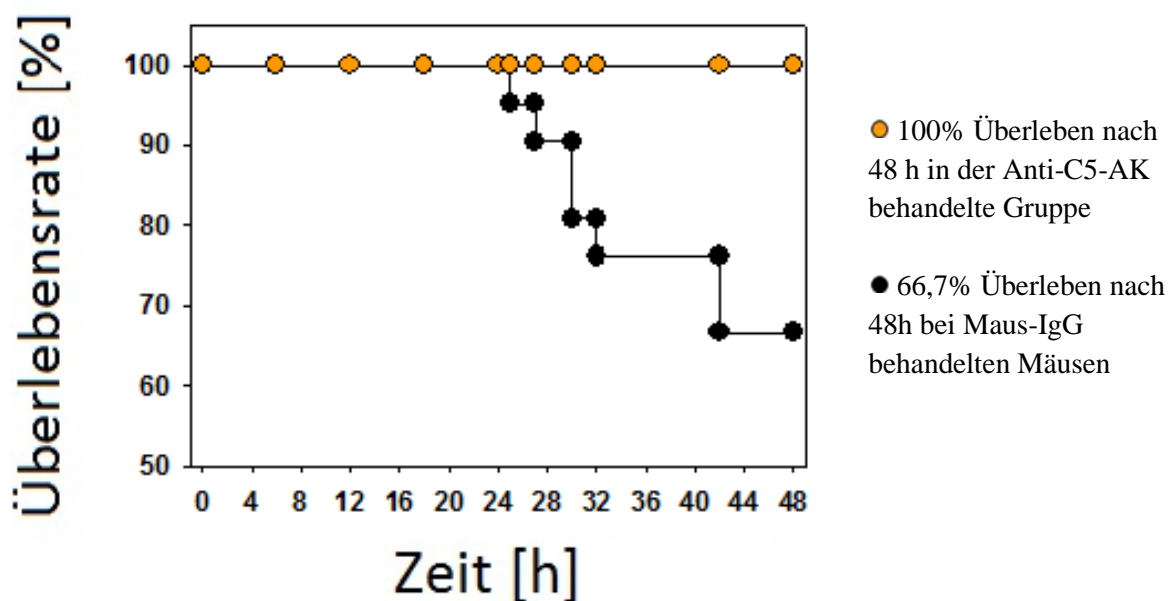
**Maus-IgG****anti-TLR-2/4-AK**

Legende: repräsentative Hirnschnitte von Mäusen, die mit PBS, Dexamethason, Maus-IgG oder anti-TLR-2/4-Antikörpern adjuvant behandelt und 48 Stunden nach der Infektion euthanasiert worden waren.

Im Gegensatz dazu führte die anti-C5-Behandlung zu folgenden Beobachtungen:

(1) im Beobachtungsintervall verstarb keine der anti-C5-AK behandelten Mäuse (0 von 10 Mäusen), während die Sterblichkeitsrate in der Placebo-Gruppe bei 33,3 % (7 von 21 Mäusen) lag (Abb. 24)

Abb. 24: Auswirkung einer adjuvanten Therapie mit anti-C5-AK auf die Überlebensrate im kliniknahen Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis

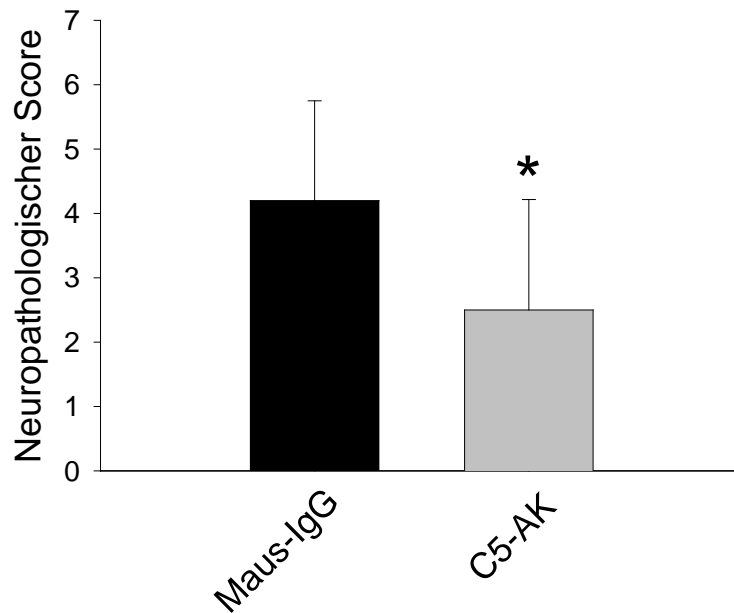


Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; Anti-C5-AK = mit murinem anti-C5-Antikörper-behandelte Mäuse (n = 10); Maus-IgG = mit murinem Immunglobulin G-behandelte Mäuse (n = 21)



(2) Dieser protektive Effekt scheint - zumindest teilweise - auf einer Reduktion der intrakraniellen Komplikationen zu beruhen. So waren bei den BB5.1-behandelten Mäusen die neuropathologischen Veränderungen geringer ausgeprägt als bei den Placebo-behandelten Mäusen (Abb. 25).

Abb. 25: Auswirkung einer adjuvanten Therapie mit anti-C5-Antikörpern auf Meningitis-induzierte neuropathologische Veränderungen

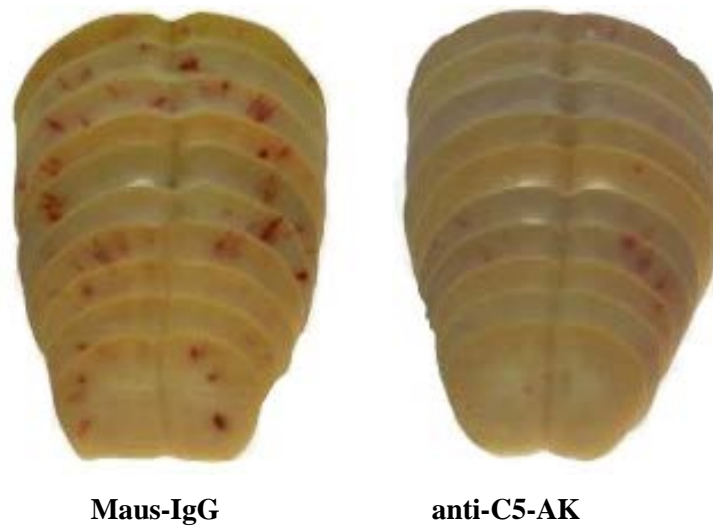


Legende: Mäuse-Stamm: C57Bl6/n; C5-AK = mit murinem anti-C5-Antikörper-behandelte Mäuse (n = 10); Maus-IgG = mit murinem Immunglobulin G-behandelte Mäuse (n = 21); \* p = 0,032, im Vergleich zu mit Maus-IgG behandelten Mäusen.

Auch die Fläche und Anzahl intrakranieller Blutungen war in der C5-Antikörper-Gruppe geringer ausgeprägt als bei Placebo-Tieren. Dies wird in Abbildung 26 an Hirnschnitten repräsentativer Mäuse aus beiden Versuchsgruppen veranschaulicht.

(3) Erfreulich war zudem, dass durch die anti-C5-Antikörpergabe die Antibiotika-induzierte Elimination der Keime nicht beeinträchtigt wurde ( $1,6 \pm 1,6 \log_{10}$  KBE/Kleinhirn bei anti-C5-behandelten Mäusen, im Vergleich zu  $2,2 \pm 1,5 \log_{10}$  KBE/Kleinhirn in der Placebogruppe).

Abb. 26: Auswirkung einer adjuvanten Therapie mit anti-C5-Antikörpern auf Meningitis-assoziierte zerebrale Hämorrhagien



Legende: repräsentative Hirnschnitte von zwei Mäusen, die entweder mit Maus-IgG oder anti-C5-Antikörpern adjuvant behandelt und 48 Stunden nach der Infektion euthanasiert worden waren.

Als Fazit lässt sich somit festhalten, dass eine adjuvante Therapie mit anti-C5-Antikörpern den Krankheitsverlauf einer Pneumokokken-Meningitis positiv beeinflussen kann und in seiner Wirksamkeit der gängigen Behandlung mit Dexamethason deutlich überlegen ist.

## 4 Diskussion

Der thematische Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit liegt auf der Charakterisierung der Funktion terminaler Komplementfaktoren in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis. Zur Klärung dieser Fragestellung führten wir experimentelle Untersuchungen in zwei Mausmodellen der Pneumokokken-Meningitis und an humanen Liquorproben durch. Das sogenannte Akutmodell (mit einer Beobachtungsdauer von 24 Stunden) eignet sich hervorragend zur Beurteilung der pathogenetischen Relevanz bakterieller und wirtseigner Faktoren, während das sogenannte kliniknahe Modell, in dem die Tiere 24 Stunden nach der Infektion antimikrobiell behandelt werden, zur Testung adjuvanter Behandlungsmaßnahmen bei der Pneumokokken-Meningitis entwickelt wurde. Zur Identifikation des immunregulatorisch entscheidenden Komplementfaktors setzten wir zunächst im Akutmodell Mäusestämme mit genetischen Modifikationen ein. Im Einzelnen verwendeten wir (1) Mäuse, denen entweder der Rezeptor für das Anaphylatoxin C3a (C3aR) fehlte oder die C3a im Zentralnervensystem überexprimierten, (2) Mäuse, die entweder eine Spontanmutation im C6-Gen aufwiesen und dadurch keinen funktionalen terminalen Komplementkomplex bilden konnten oder denen CD59a, ein endogener Inhibitor der terminalen Komplementaktivierung, fehlte, oder (3) Mäuse, die keinen funktionalen Rezeptor für das Anaphylatoxin C5a (C5aR) exprimierten. Den markantesten Phänotyp beobachteten wir bei C5aR-defizienten Mäusen. Bei diesem Mäusestamm war die Entzündungsreaktion wesentlich geringer ausgeprägt als bei entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Die abgeschwächte Immunreaktion ging zudem mit einer deutlichen Abnahme der neuropathologischen Veränderungen und konsekutiv einer Verbesserung des klinischen Verlaufs einher, ohne aber zu einer Zunahme des bakteriellen Wachstums im Liquorraum zu führen. Kurz zusammengefasst demonstrierten diese Versuchsreihen, dass C5a der immunregulatorisch entscheidende Komplementfaktor und damit ein möglicher Angriffspunkt für eine Behandlung der Pneumokokken-Meningitis ist. Zur Klärung dieser Frage führten wir zunächst eine Versuchsreihe durch, in der wir die Wirksamkeit eines anti-C5-Antikörpers (BB5.1) im Akutmodell evaluierten. Nach der erfolgreichen Testung untersuchten wir die Wirkung des anti-C5-Antikörpers in einem kliniknahen Modell und zwar im Vergleich mit Dexamethason, dem Medikament der Wahl bei der adjuvanten Therapie der Pneumokokken-Meningitis (Brouwer et al., 2010a) und mit Antikörpern gegen TLR2 und TLR4, zwei essentiellen Rezeptoren bei der Erkennung einer Pneumokokken-Infektion des Liquorraums (Koedel, 2009). Durch die adjuvante Therapie

mit anti-C5-AK konnten der klinische Verlauf entscheidend verbessert und die neuropathologischen Veränderungen deutlich reduziert werden. Im Gegensatz dazu wurde weder durch die Gabe von Dexamethason noch von Antikörpern gegen TLR2 und TLR4 die Meningitis-assoziierte Gewebeschädigung und Sterblichkeitsrate verringert. Um Aufschluss über die Bedeutung terminaler Komplementfaktoren bei der menschlichen Erkrankung zu bekommen, führten wir überdies eine Proteinexpressionsanalyse an einem ausgewählten Patientenkollektiv (Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis) durch. Diese Untersuchung zeigte eine deutliche Erhöhung der C5a- und C5b-C9-Konzentrationen im Liquor von Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis sowie eine Korrelation dieser Faktoren mit dem Ausmaß der Entzündungsreaktion und dem klinischen Zustand bei Aufnahme. Somit könnte die Neutralisation von C5 einen vielversprechenden Ansatz zur adjuvanten Therapie der Pneumokokken-Meningitis darstellen.

#### 4.1 Einordnung der eigenen Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung

Erste konkrete Hinweise auf eine Beteiligung des Komplementsystems bei der bakteriellen Meningitis lieferten Untersuchungen von Buchanan und Macnab im Jahre 1972. Diese zeigten eine erhöhte Komplement-Aktivität bei Patienten mit bakterieller Meningitis. In der Folgezeit wurden verschiedene Studien publiziert, die diese Beobachtung bestätigten und vertieften. So berichteten Zwahlen et al. (1982), dass die Komplement-vermittelte opsonische Aktivität (CMOA) im Liquor bei 15 von 27 Patienten mit akuter bakterieller Meningitis (nicht aber bei Kontrollpatienten und Patienten mit einer viralen Meningitis) erhöht war. Zudem wurde ein statistischer Zusammenhang zwischen einem guten klinischen Verlauf und dem Nachweis einer erhöhten CMOA festgestellt. Ferner wurde eine positive Korrelation zwischen günstigem klinischen Verlauf und hohen Liquor-Konzentrationen von C4 und C3 beschrieben (Zwahlen et al., 1982). Bei Untersuchungen zur chemotaktischen Wirkung von Liquorproben von Patienten mit einer Meningokokken- oder Pneumokokken-Meningitis auf neutrophile Granulozyten stellte Greenwood im Jahre 1978 eine hochsignifikante, positive Korrelation zwischen chemotaktischer Aktivität und den Liquor-C3-Spiegeln fest (Greenwood, 1978). Erhöhte Konzentrationen des Komplementfaktors C3 wurden ebenfalls in einer Studie von Stahel et al. (1997b) bei Patienten mit einer akuten bakteriellen Meningitis beobachtet.

Darüber hinaus wurden von dieser Arbeitsgruppe in Liquorproben von Meningitis-Patienten erhöhte Konzentrationen der Komplementfaktoren Faktor B und C5a (im Vergleich zu Kontrollpatienten und Patienten mit einer aseptischen Meningitis) festgestellt.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei Patienten mit bakterieller Meningitis wurde auch in Tiermodellen ein Anstieg der Konzentration diverser Komplementfaktoren während einer bakteriellen Meningitis beobachtet. So demonstrierten beispielsweise Stahel et. al, dass die (mRNA-) Expression der Komplementfaktoren C3 und Faktor B (1997b) sowie des C5a-Rezeptors (1997a) in Hirnen von Mäusen mit einer Listerien-Meningoenzephalitis signifikant höher als im Hirn von Kontrollmäusen war. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten ferner, dass – abgesehen vom Komplementfaktor C3 – der Rezeptor für das Anaphylatoxin C3a und Faktoren des klassischen Komplementwegs wie C1q und C1r innerhalb von 24 Stunden nach Infektion im Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis signifikant hochreguliert werden (Rupprecht et al., 2007). In dieser Dissertationsarbeit lieferten wir nun den Nachweis, dass die Expression terminaler Komplementfaktoren (C5a und C5b-C9) im Verlauf einer experimentellen Pneumokokken-Meningitis signifikant ansteigt. Zusätzlich konnten wir eine signifikante Erhöhung der Liquorkonzentrationen dieser Komplementfaktoren bei Patienten mit Pneumokokken-Meningitis demonstrieren.

Um die Funktion des Komplementsystems bei der bakteriellen Meningitis genauer zu charakterisieren, wurden weitere Studien in Tiermodellen durchgeführt. Im Jahre 1985 berichteten Ernst et al., dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Granulozyten in den Liquorraum spielt: In einem Kaninchenmodell wurde eine Erhöhung der chemotaktischen Aktivität im Liquor ab der 12. Stunde nach intrathekaler Infektion mit Pneumokokken festgestellt (Maximum zwischen der 18. und 20. Stunde post infectionem). In engem zeitlichem Zusammenhang mit dieser Aktivitätserhöhung kam es zur Einwanderung von Granulozyten in den Liquorraum (ab der 14. Stunde, Maximum zwischen der 16. und 20. Stunde nach der Infektion). In weiteren Untersuchungen in der Boyden-Chemotaxiekammer konnte diese chemotaktische Aktivität durch Zugabe von funktionsblockierenden Antikörpern gegen das Anaphylatoxin C5a (nicht aber C3a) stark abgeschwächt werden. Ferner konnte durch eine Vorbehandlung der Granulozyten mit aufgereinigtem Kaninchen-C5a die chemotaktische Wirkung von Liquorproben von Kaninchen mit einer Pneumokokken-

Meningitis blockiert werden. Diese Versuchsansätze lieferten somit erste Hinweise auf eine besondere Rolle des Faktors C5 in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ernst et al (1985) sprechen die Beobachtungen von Tuomanen et. al. (1986) gegen eine wichtige Funktion des Komplementsystems bei der Pneumokokken-Meningitis: Tuomanen et al. verwendeten das gleiche Versuchsmodell. Zur Analyse der Funktion des Komplementsystems wurden die Kaninchen vor der Krankheitsinduktion mit Kobra-Gift-Faktor behandelt, einem Komplement-aktivierenden Protein, das in der Folge eine Dekomplementierung verursacht. Die Depletion des Komplementsystems hatte keinerlei Auswirkung auf die Gesamtzahl der Leukozyten im Liquor, sie ging lediglich mit einer geringfügigen zeitlichen Verzögerung in der Immigration der Leukozyten in den Liquorraum einher. Allerdings wurde durch die Dekomplementierung die Opsonophagozytose der Pneumokokken im Liquorraum beeinträchtigt. Dies hatte signifikant erhöhte bakterielle Titer im Liquor und Blut zur Folge.

In früheren Untersuchungen zur Funktion des Komplementsystems bei der Pneumokokken-Meningitis verwendete unsere Arbeitsgruppe C3- und C1q-defiziente Mäusestämme, bei denen somit entweder alle Komplementaktivierungswege (C3-Defizienz) oder nur der klassische Komplementweg (C1q-Defizienz) ausgeschaltet waren (Rupprecht et al., 2007). Die wesentlichen Befunde dieser Versuchsreihe waren erstens: beide genetischen Defizienzen waren mit einer gestörten Elimination der Pneumokokken in Liquor und Blut vergesellschaftet. Zweitens: beide Stämme wiesen 24 Stunden nach der intrazisternalen Infektion niedrigere Liquor-Leukozytenzahlen und geringere Zytokin-Konzentrationen (z. B. IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-1 und CXCL-2) im Hirn als entsprechende Wildtyp-Mäuse auf. Die abgeschwächte Entzündungsreaktion ging mit einer Reduktion intrakranieller Komplikationen einher. So waren beispielsweise der intrakranielle Druck und die Liquor-Albumin-Konzentration (ein Parameter für die Blut-Hirn-Schranken-Integrität) bei C3-defizienten Mäusen signifikant niedriger als bei infizierten Wildtyp-Mäusen. Überraschenderweise war jedoch die Sterblichkeitsrate bei C1q und C3-defizienten Mäusen erhöht. Letzteres könnte auf der eingeschränkten Erregerelimination und der dadurch bedingten Verschlimmerung systemischer Komplikationen beruhen. In Übereinstimmung mit unseren Befunden beschrieben Zwijnenburg et al. (2007) eine protektive Wirkung einer C1-Inhibitor Therapie bei der experimentellen Pneumokokken-Meningitis im Akutmodell bei Ratten und Mäusen. Der C1-Inhibitor-Faktor hemmt C1r

und C1s, Komponenten des klassischen Komplementwegs (Kirschfink et al., 1999). Eine mögliche weitere Wirkung stellt die Inhibition des Faktors XII und Prekallikrein dar (de Agostini et al., 1984; Schapira et al., 1985). Durch die Behandlung mit C1-Inhibitor konnte der klinische Verlauf der Erkrankung signifikant verbessert werden. Die klinische Verbesserung ging mit einer Reduktion der Liquor-Leukozytenzahlen und der Hirn-Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen (z. B. IL-6, IL-1 $\alpha$ , CXCL1, CXCL2) einher. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Ernst et al. (1984), Zwijnenburg et al. (2007), und unserer eigenen Arbeitsgruppe (Rupprecht et al., 2007) stehen im Widerspruch zu denen von Tuomanen et al. (1986), die keine Wirkung von CVF auf die Granulozytenzahlen im Liquor zeigten. Der fehlende Effekt von CVF könnte auf folgenden Gegebenheiten beruhen: (1) auf einer Degradation von CVF und einem damit einhergehenden Wirkungsverlust von CVF im Verlauf der Infektion (Fu et al., 1997), (2) auf einer (kompensatorischen) Hochregulation der Komplement-Synthese im Gehirn, und/oder (3) auf Komplement-unabhängigen Wirkungen des CVF (Libert et al., 1999; Rupprecht et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die bisherigen Daten auf eine wichtige Bedeutung des Komplementsystems bei der bakteriellen Meningitis hinwiesen. So werden im Krankheitsverlauf Komplementfaktoren im ZNS vermehrt produziert. Diese Komplementfaktoren leisten einen wichtigen Beitrag zur Opsonophagozytose der Erreger und fungieren als Regulatoren der Entzündungsreaktionen. Unklar war jedoch, welche Faktoren für die immunregulatorische Wirkung des Komplementsystems verantwortlich sind. Potentielle Kandidaten sind die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie der terminale Komplementkomplex.

#### 4.2 Bewertung der Rolle von C3a, C5a und terminalem Komplementkomplex in der Entzündungsregulation der Pneumokokken-Meningitis

Die Anaphylatoxine C3a und C5a sind hochwirksame Entzündungsmediatoren. Sie lösen auf verschiedenen Zielzellen und Geweben eine Vielzahl proinflammatorischer Reaktionen aus. So wirken sie beispielsweise chemotaktisch (Haas et al., 2007; Marder et al., 1985), bewirken die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus Granulozyten und induzieren die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ,

in Monozyten und Makrophagen (Haas et al., 2007; Sacks et al., 1978). Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie Kandidatenmoleküle für die Regulation der Entzündungsreaktion bei der Pneumokokken-Meningitis. Auch der terminale Komplementkomplex stellt ein Kandidatormolekül für die Immunmodulation bei der Pneumokokken-Meningitis dar. Wie schon beschrieben setzt er sich aus den Faktoren C5b-C9 zusammen und führt membrangebunden als Membran-Angriffs-Komplex (MAC) zur Lyse Gram-negativer Bakterien, wie zum Beispiel von *Neisseria meningitidis* (Frank et al., 1987). In seiner löslichen Form (sTCC: löslicher terminaler Komplement-Komplex) kann er auch pro-inflammatorische und chemotaktische Effekte, vor allem auf neutrophile Granulozyten (Kilgore et al., 1996), vermitteln (Casarsa et al., 2003).

Im Rahmen dieser Disserationsarbeit bestimmten wir die Konzentrationen von C5a und C5b-C9 in Liquorproben von Menschen mit einer Pneumokokken-Meningitis. Die Liquorspiegel beider Faktoren waren bei Pneumokokken-Meningitis-Patienten deutlich höher als bei Kontrollpatienten und Patienten mit einer viralen Meningitis. Zudem korrelierten die Konzentrationen mit der Liquor-Leukozytenzahl (im Falle von C5a erst in einer Folgestudie an einer größeren Patientenkohorte) und dem klinischen Zustand bei Aufnahme. Analog zur Situation bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis konnten wir auch im Mausmodell deutlich höhere Konzentrationen dieser Komplementfaktoren im Hirnlysat von infizierten Mäusen als in dem von Kontrolltieren feststellen. Unsere Untersuchungen an transgenen Mäusestämmen lieferten darüber hinaus klare Hinweise dafür, dass das Anaphylatoxin C5a, nicht aber C3a und TCC, eine zentrale Funktion in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis spielt. Nur bei C5aR-defizienten Mäusen (nicht aber bei C3aR-defizienten Mäusen oder Mäusen mit einer Mutation im C6-Gen) konnte eine signifikante Reduktion der Expression von Zytokinen und Chemokinen und folglich auch der Liquor-Leukozytenzahlen beobachtet werden. Die mildere Entzündungsreaktion ging mit einer Abnahme der neuropathologischen Veränderungen und einem besseren klinischen (Akut-)Verlauf einher.

Unterschiede in der pathophysiologischen Bedeutung einzelner Anaphylatoxine und des TCC wurden auch in anderen Tiermodellen beobachtet. Beispielsweise gingen in Tiermodellen der *Escherichia coli*- und der polymikrobiellen Sepsis die genetische Defizienz von C5aR und die pharmakologische Antagonisierung von C5a mit einer Reduktion der Immunreaktion, der Organschädigungen und der Sterblichkeitsrate einher (Hoehlig et al., 2013; Hollmann et al., 2008; Huber-Lang et al., 2002). Im Gegensatz dazu



war die genetische Ausschaltung des C3a-Rezeptors mit einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion und höheren Sterblichkeitsrate (im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen) vergesellschaftet (Kildsgaard et al., 2000; Hollmann et al., 2008). Ferner konnte durch die Gabe von exogenem C3 die bakterielle Elimination und die Überlebensrate bei der Sepsis verbessert werden (Yuan et al., 2011). Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, dass C5a ein zentraler Mediator der Hyperinflammation und Gewebeschädigung bei der Sepsis ist, während C3a eher eine anti-inflammatorische und somit protektive Rolle zu spielen scheint. Die Datenlage zur Rolle des TCCs bei der Sepsis ist dagegen uneinheitlich. Während Buras et al. (2004) in einem Rattenmodell der polymikrobiellen Sepsis (CASP-Modell) eine höhere Überlebensrate bei C6-defizienten und somit TCC-defizienten Ratten als bei Wildtyp-Ratten beobachteten, berichteten Flierl et al. (2008), dass die fehlende Produktion von TCC bzw. MAC bei C3- und C5-defizienten Mäusen ein unkontrolliertes bakterielles Wachstum und damit eine erhöhte Letalität in einem Mausmodell der polymikrobiellen Sepsis (CLP-Modell) bedingt. Eine mögliche Erklärung für diese divergenten Befunde sind Unterschiede in der Tierspezies, im Erregerspektrum und/oder im Tiermodell. Die Darmflora ist bei unterschiedlichen Spezies, wie Ratte und Maus, nicht identisch (Ley et al., 2008a, 2008b). Folglich ist bei einer durch eine Kolonpunktion bzw. einen Kolon-Stent induzierten polymikrobiellen Sepsis mit Unterschieden im Erregerspektrum zu rechnen. Der Membranangriffskomplex wiederum wirkt nur auf bestimmte Gram-negative Bakterien wie einzelne *Escherichia coli*-, Salmonellen- oder Neisserienstämme bakterizid (Joiner et al., 1984; Taylor, 1992; Tomlinson et al., 1989). Zudem wurden Unterschiede in der bakteriellen Ausbreitung, der systemischen Zytokinexpression und den pathologischen Veränderungen zwischen CASP- und CLP-Modell beschrieben (Maier et al., 2004).

Die beobachteten Unterschiede in der pathophysiologischen Bedeutung der Anaphylatoxine C5a und C3a sowie von C5b-C9 bei der Pneumokokken-Meningitis - aber auch der Sepsis - lassen sich vermutlich auf Divergenzen im Wirkungsspektrum und in der Wirkungsaktivität dieser Komplementfaktoren zurückführen. C5a wird als das wirksamste proinflammatorische Peptid unter den (bekannten) Komplementaktivierungsprodukten angesehen (siehe Übergangsarbeiten von Arumugam et al., 2009 und Guo et al., 2005). C5a besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, stimuliert die Sekretion lysosomaler Enzyme und proinflammatorischer Zytokine aus Granulozyten, Monozyten sowie Makrophagen, und induziert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Phagozyten (Daffern et al., 1995;

Haas et al., 2007; Haynes et al., 2000; Manthey et al., 2009; van Epps et al., 1984). Im Vergleich zu C5a weist C3a keine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten (Hugli, 1981) auf; die stimulatorische Wirkung von C3a auf Granulozyten (z.B. deren Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies) ist vergleichsweise gering (Arumugam et al., 2009; Daffern et al., 1995; Hugli 1981; van Epps et al., 1984). Der terminale Komplementkomplex wiederum scheint nur indirekt durch Induktion der endothelialen Chemokin-Freisetzung zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beizutragen (Kilgore et al., 1996). Darüber hinaus haben die genannten Komplementaktivierungsprodukte unterschiedliche Effekte auf die Funktion des Gefäßendothels, dessen Wechselwirkung mit den Leukozyten deren Migrationsverhalten determiniert (Ley et al., 2006, van Hinsbergh, 2012, Zarbock et al., 2008): So löst C5a, nicht aber C3a oder sublytische Konzentrationen von C5b-C9 eine Zellretraktion, Desintegration der endothelialen Zellschicht und Erhöhung der parazellulären Permeabilität aus (Kilgore et al., 1996; Schraufstatter et al., 2002) und erleichtert auf diese Art die Transmigration von Leukozyten. Zusätzlich zu den Unterschieden im Wirkungsmechanismus könnten Unterschiede im Aktivierungsmechanismus eine mögliche Erklärung für die divergente Bedeutung von C5a, C3a und C5b-C9 bei der Pneumokokken-Meningitis sein: Während C5b-C9 Endprodukt der Komplementaktivierungskaskade ist, können die Anaphylatoxine C3a und C5a vermutlich auch über extrinsische Stoffwechselwege generiert werden (Manthey et al., 2009). So scheinen Serinpeptidasen, wie Thrombin, C3 und C5 in die entsprechenden biologisch aktiven Anaphylatoxine umwandeln zu können. Zudem wurde berichtet, dass aktivierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen mittels sezernierter Serinproteasen aus C5 aktives C5a bilden können (Amara et al., 2008).

Kurz zusammengefasst, zeigte unsere Studie, dass C5a, nicht aber C3a und C5b-9, entscheidend zur Entzündungsreaktion und den damit assoziierten Gewebeschäden beiträgt. Auf die wichtigsten Wirkmechanismen von C5a soll in der Folge näher eingegangen werden.

#### 4.3 Diskussion der möglichen Wirkmechanismen von C5a

Das Anaphylatoxin C5a kann über verschiedene Wirkmechanismen zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der Entzündungsreaktion bei der Pneumokokken-Meningitis beitragen. Wie oben bereits erwähnt, besitzt C5a eine starke chemotaktische Wirkung auf

Granulozyten, aber auch auf Monozyten (Bengtson et al., 1986; Haas et al., 2007; Skattum et al., 2011). Zudem kann C5 die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine durch verschiedene Immunzellen induzieren und dadurch indirekt zur Leukozytenwanderung beitragen (Ricklin et al., 2010). Schließlich wurde ein inhibitorischer Effekt von C5a auf den apoptotischen Zelluntergang neutrophiler Granulozyten beschrieben (Guo et al., 2006; Perianayagam et al., 2002).

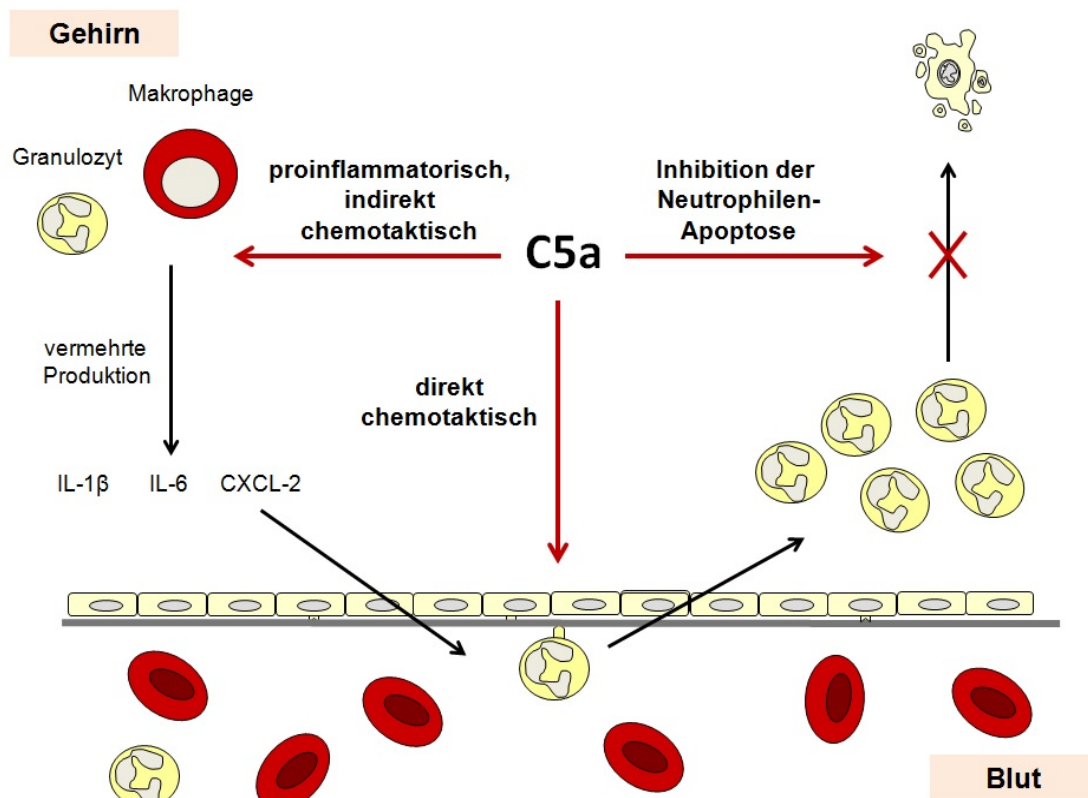
In unserer Studie waren die Liquorzellzahlen bei infizierten Mäusen, denen entweder der Rezeptor C5aR fehlte oder die mit C5-Antikörpern vorbehandelt waren, signifikant niedriger als bei den entsprechenden Vergleichstieren. Die Reduktion der Liquorpleozytose ging mit einer geringeren Produktion der Neutrophilen-Chemokine CXCL1 und CXCL2 einher. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten ferner gezeigt, dass durch eine Vorbehandlung mit Antikörpern gegen CXCL1 und CXCL2 eine deutliche Abnahme der Liquorpleozytose (um etwa 60%) erzielt werden kann, allerdings in einem geringeren Umfang als durch eine Vorbehandlung mit C5-Antikörpern oder die entsprechende C5aR-Gendefizienz (um annähernd 80%). Diese Befundkonstellation deutet darauf hin, dass C5a sowohl direkt, als chemotaktischer Faktor, als auch indirekt, als Auslöser einer Chemokin-Produktion zur Rekrutierung von Blutleukozyten in den Liquorraum beiträgt. Auf eine zentrale Rolle von C5a bei der Leukozyteneinwanderung in den Liquorraum hatten schon frühere Publikationen hingewiesen. So löste die intrathekale Applikation von zuvor aus Kaninchenserum isoliertem, aufgereinigtem C5a in einem Kaninchenmodell eine Liquor-Pleozytose aus, d.h. C5a wirkte direkt chemotaktisch (Ernst et al., 1984; Faustmann et al., 1995). Des Weiteren konnte durch eine pharmakologische Blockade von C5a die chemotaktische Wirkung von Liquorproben infizierter Kaninchen auf neutrophile Granulozyten inhibiert werden (Ernst et al., 1984; Haynes et al., 2000). Zudem wurde im Maus- und Rattenmodell der Pneumokokken-Meningitis nach einer Vorbehandlung mit (einem) C1-Inhibitor, der den klassischen Komplementaktivierungsweg hemmt und folglich auch der Bildung von C5a entgegenwirkt, eine geringer ausgeprägte Liquor-Pleozytose und niedrigere Konzentrationen an Zytokinen und Chemokinen (z.B. IL-1 $\alpha$ , IL-6, CXCL1 und CXCL2) beobachtet (Zwijnenburg et al., 2007).

Eine weitere mögliche Funktion von C5a bei der Immunregulation ist die Beeinflussung der Überlebenszeit neutrophiler Granulozyten. Letztere haben in der Blutbahn normalerweise eine kurze Lebensdauer (von mehreren Stunden), bevor sie einen

programmierten Zelltod (Apoptose) erfahren und in der Leber und Milz abgeräumt werden (Geering et al., 2013; Jaber et al., 2001; Kolaczowska et al., 2013; Squier et al., 1995; Summers et al., 2010). Die Emigration und Aktivierung der Neutrophilen während einer Entzündungsreaktion kann zu einer signifikanten Verzögerung der Apoptose führen (Borregaard, 2010; Fox et al., 2010; Kennedy et al., 2009; Watson et al., 1997). Dementsprechend wurde im Mausmodell der Zytokin-induzierten Meningitis eine deutlich geringere Apoptoserate bei Neutrophilen, die aus dem Liquor gewonnen wurden, als bei Neutrophilen im Blut beobachtet (Coxon et al., 1999). Im Mausmodell der experimentellen Pneumokokken-Meningitis wurde zudem demonstriert, dass die Hemmung der Neutrophilenapoptose zur Persistenz und Verstärkung der Immunreaktion und folglich zur Verschlimmerung der Gewebeschäden beiträgt (Koedel et al., 2009). Da C5a die Neutrophilen-Apoptose signifikant hemmen kann (Perianayagam et al., 2002; Perianayagam et al., 2004), wäre es denkbar, dass die fehlende Inhibition der Neutrophilen-Apoptose bei C5aR-defizienten und C5-AK-behandelten Mäusen ebenfalls einen Beitrag zur beobachteten Abnahme der Liquorpleozytose leistet.

Insgesamt können die drei beschriebenen Wirkmechanismen die Reduktion der Liquorpleozytose bei den C5aR-defizienten Mäusen erklären (Abb. 27).

Abb. 27: Wirkmechanismen von C5a bei der Pneumokokken-Meningitis



Anmerkung: Die vermehrte Bildung von C5a bei der Pneumokokken-Meningitis trägt entscheidend zur Liquorpleozytose (hauptsächlich neutrophile Granulozyten) bei der Pneumokokken-Meningitis bei. Dies wird vor allem durch drei Wirkmechanismen erzielt: (1) C5a wirkt direkt chemotaktisch. (2) C5a stimuliert Makrophagen und Granulozyten zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und CXCL-2, die wiederum die Einwanderung von Leukozyten in den Liquorraum bedingen. D.h. C5a wirkt indirekt chemotaktisch. (3) C5a inhibiert die Apoptose von Neutrophilen und verlängert so deren Lebensdauer.

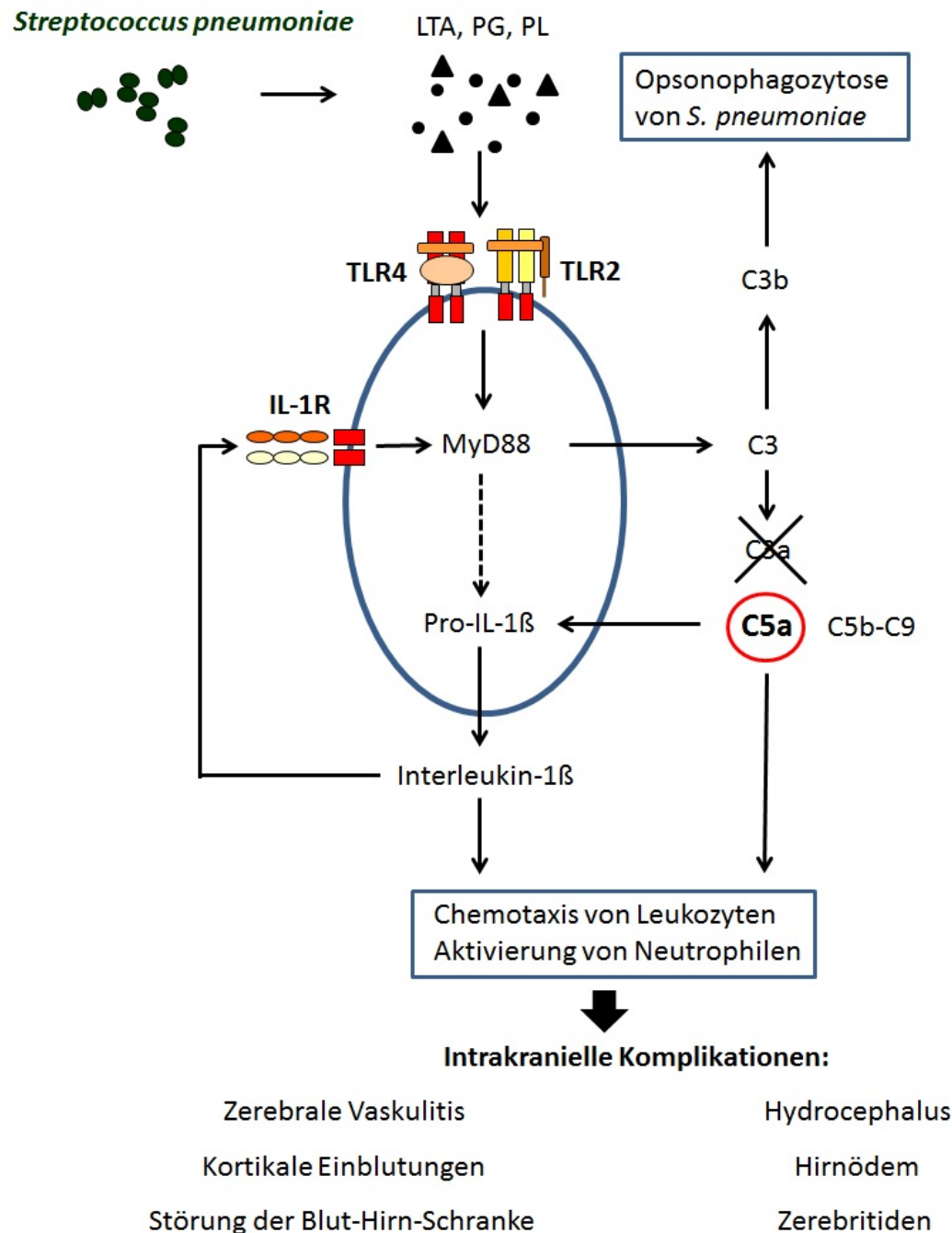
#### 4.4 Bedeutung terminaler Komplementfaktoren in der Entzündungskaskade der Pneumokokken-Meningitis

Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben deutliche Hinweise auf eine zentrale Funktion des Komplementsystems in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis geliefert. Im folgenden Abschnitt soll nun die Stellung einzelner Komplementfaktoren (insbesondere von C5a) in der Entzündungskaskade der Pneumokokken-Meningitis genauer definiert werden.

Wie in der Einleitung (siehe 1.2) beschrieben, führen Autolyse und Antibiotikatherapie zur Freisetzung subkapsulärer bakterieller Bestandteile, wie Lipoteichonsäure, Peptidoglykan und Pneumolysin. Diese fungieren als PAMPs und binden an

Mustererkennungsrezeptoren immunkompetenter Zellen, wie beispielsweise TLR-2 und -4 (Klein et al., 2008). Durch diese Interaktion wird eine MyD88-abhängige Signalkaskade getriggert, die letztendlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B führt, die wiederum die Expression diverser proinflammatorischer Faktoren steuern. Abgesehen von Zytokinen wie IL-1 $\beta$  oder Chemokinen wird auch die Bildung zahlreicher Komponenten des Komplementsystems, wie beispielsweise des zentralen Komplementfaktors C3, induziert (Koedel, 2009; Koedel et al., 2004). Die Hochregulation der Komplementexpression ist im ZNS einer wichtiger Mechanismus des Immunsystems, Pathogene abzuwehren. Wie schon erwähnt, werden unter physiologischen Bedingungen dort keine oder nur wenig Komplementfaktoren exprimiert (Rupprecht et al., 2007; Simberkoff et al., 1980). Für die Erkennung und anschließende Phagozytose von *S. pneumoniae* scheint vornehmlich das Opsonin C3b relevant zu sein (Rupprecht et al., 2007), während das Anaphylatoxin C5a (nicht aber C3a) entscheidend zur Entzündungsverstärkung beiträgt. Dabei scheint C5a zum einen durch seine direkte chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, zum anderen durch seine proinflammatorische Aktivität die Entzündungsreaktion anzutreiben. Letzteres führt über einen positiven Rückkopplungsmechanismus zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  wiederum bewirkt über den IL-1-Rezeptor eine weitere Aktivierung von MyD88, andererseits trägt es zur Rekrutierung von Blut-Leukozyten in den Liquorraum bei (Koedel et al., 2002b; Zwijnenburg et al., 2003). Dadurch kommt es zur Verstärkung und Perpetuierung der Entzündungsreaktion, was wiederum die Entstehung Meningitis-assoziiierter intrakranieller Komplikationen und Gewebeschäden begünstigt (Abb. 28).

Abb. 28: C5a: ein zentraler Regulator der Immunantwort bei der Pneumokokken-Meningitis



Anmerkung: Autolyse und Antibiotikatherapie führen zur massiven Freisetzung von Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglykan (PG) und Pneumolysin (PL), die durch Bindung an TLR2/4 Rezeptoren immunkompetente Zellen aktivieren. Über den MyD88-abhängigen Signalweg exprimieren diese dann zahlreiche Entzündungsmediatoren, wie IL-1β und Komplementfaktor C3. Für die Rekrutierung von Leukozyten sowie deren Aktivierung scheinen vor allem das Anaphylatoxin C5a und IL-1β-abhängige Signale verantwortlich zu sein. Die massive Infiltration von Leukozyten trägt entscheidend zur Entstehung von intrakraniellen Komplikationen wie Hirnödem bei. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass C3a und C5b-C9 nicht als entscheidende Immunmodulatoren der Pneumokokken-Meningitis fungierten.

#### 4.5 Neutralisation des terminalen Komplementfaktors C5a: eine neue adjuvante Therapieoptionen bei der Pneumokokken-Meningitis?

Heute wird eine gezielte entzündungshemmende Therapie als erfolgversprechendste Strategie betrachtet, um die Entstehung Meningitis-assoziiierter intrakranieller Komplikationen zu verhindern und damit die Prognose der Erkrankung zu verbessern.

Gegenwärtig ist Dexamethason das einzige immunsuppressive Medikament, für das ein positiver Effekt auf den Verlauf einer Pneumokokken-Meningitis berichtet wurde (van de Beek et al., 2007). Dieser positive Effekt wird jedoch nur dann beobachtet, wenn die Dexamethasontherapie vor oder zumindest simultan mit der Antibiotikatherapie eingeleitet wird. Es ist also keine Nachbehandlung möglich (siehe Übersichtsarbeit (Peltola et al., 2007)). Überdies führte die adjuvante Dexamethasontherapie „lediglich“ zu einer Verringerung der Sterblichkeitsrate der Pneumokokken-Meningitis (auf immer noch 14%), hatte aber keinerlei Auswirkungen auf die Häufigkeit neurologischer Folgeschäden. Zudem zeigten klinische Studien der letzten Jahre, dass die adjuvante Dexamethasontherapie bei Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium sowie in Ländern mit einer schlechten Gesundheitsinfrastruktur weder die Sterblichkeitsrate verringern noch die Residualschäden verhindern konnte (Molyneux et al., 2002; Scarborough et al., 2007). Dies gilt auch für immundefiziente Patienten, die zum Beispiel an HIV leiden (Peltola et al., 2007; Vardakas et al., 2009). Diese Daten machen deutlich, dass dringend zusätzliche oder alternative Medikamente für die adjuvante Therapie der Pneumokokken-Meningitis benötigt werden, die das Risiko neurologischer Folgeschäden drastisch verringern, zudem die Prognose von Patienten, die bei der stationären Aufnahme bereits schwer(st) erkrankt sind, verbessern und auch nach bereits begonnener Antibiotikatherapie verabreicht werden können.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die adjuvante Therapie mit anti-C5-Antikörpern zu einer deutlichen Reduktion der neuropathologischen Veränderungen und zur eindrucklichen Verbesserung des klinischen Verlaufs (Überlebensrate von 100%) bei der Pneumokokken-Meningitis führt. Dieser Therapieansatz war dabei deutlich effizienter als eine Ko-Behandlung mit Dexamethason oder mit anti-TLR2-/4-Antikörpern. Eine mögliche Erklärung für die hohe Effizienz ist die erfolgte selektive Neutralisation eines zentralen Regulators der Entzündungsreaktion, ohne dabei die bakterielle Elimination der Pneumokokken negativ zu beeinflussen. Somit eröffnet sich mit der pharmakologischen Inhibition terminaler Komplementfaktoren eine Möglichkeit, die Immunreaktion



abzumildern, ohne dabei die Opsonophagozytose der Pathogene (bzw. deren Fragmente) zu behindern. Im Gegensatz dazu stellt Dexamethason einen unspezifischen Hemmstoff dar, der den Anstieg von TNF- $\alpha$  und Laktat im Liquor verringert und dadurch die sekundäre Entzündungsreaktion nach antibiotischer Therapie vermindert (Lutsar et al., 2003). Es kann somit nicht mit zentralen Schritten der Entzündungskaskade interferieren und sein Wirkspektrum ist zudem möglicherweise nicht ideal bei der Therapie der Pneumokokken-Meningitis. Dies würde auch die keineswegs überzeugenden tierexperimentellen Daten erklären (Barichello et al., 2011; Coimbra et al., 2007; Lutsar et al., 2003). Unser Therapieansatz mit anti-TLR2/4-Rezeptor-Antikörpern beruht auf Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass diese beiden Mustererkennungsrezeptoren entscheidend zur Immunaktivierung bei einer Pneumokokkeninfektion des Liquorraums beitragen. Dabei ging die TLR2/4-Defizienz mit einer verminderten Liquor-Pleozytose und Zytokinexpression sowie einer Verringerung der neuropathologischen Veränderungen einher. Ein vergleichbarer Krankheitsphänotyp zeigte sich bei infizierten Wildtyp-Mäusen, die vor der Infektion mit anti-TLR2/4-Antikörpern behandelt worden waren. Im Gegensatz dazu hatte die adjuvante Therapie mit anti-TLR2/4-AK keine nennenswerten Auswirkungen auf die Entzündungsreaktion, das Ausmaß der neuropathologischen Veränderungen und den klinischen Verlauf. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass diese Rezeptoren vor allem im Initialstadium, nicht aber im fortgeschrittenen Stadium der Pneumokokken-Meningitis von Bedeutung sind.

Abschließend lässt sich konstatieren, dass die C5-Neutralisation ein viel versprechender Ansatz für die adjuvante Therapie der Pneumokokken-Meningitis zu sein scheint. Vor der Planung einer klinischen Studie müssen jedoch noch zentrale Fragen beantwortet werden, wie z.B. nach dem therapeutischen Fenster oder nach der Wirksamkeit gegenüber Langzeitkomplikationen wie dem permanenten Hörschaden.

## 5 Zusammenfassung

Bei Untersuchungen im Mausmodell der experimentellen Pneumokokken-Meningitis hatte unsere Arbeitsgruppe festgestellt, dass Komplementfaktor 3 (C3)-abhängige Signalwege eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Entzündungsreaktion einnehmen. Der Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit lag in der Identifizierung der für diesen Effekt verantwortlichen Komplementaktivierungsprodukte.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung setzten wir zunächst Mäusestämme mit genetischen Modifikationen im Komplementaktivierungsweg ein.

Dabei wurden die Mäuse intrazisternal mit *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 2, Stamm D39) infiziert und vierundzwanzig Stunden später klinisch, mikrobiologisch und histopathologisch untersucht.

In einer ersten Versuchsreihe untersuchten wir Mäuse, denen entweder der Rezeptor für das Anaphylatoxin C3a (C3aR) fehlte oder die C3a im Zentralnervensystem überexprimierten. Dieser Versuchsansatz beruhte auf der Beobachtung, dass C3a bei entzündlichen Prozessen im Zentralnervensystem sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte haben kann. Bei den C3a-überexprimierenden Mäusen beobachteten wir eine stärker ausgeprägte Liquorpleozytose als bei entsprechenden Wildtyp-Mäusen; bei den anderen Untersuchungsparameter (wie klinischer Score, neuropathologischer Score, Zytokinkonzentrationen oder bakterielle Titer) fanden sich keine Unterschiede zwischen dem transgenen Mäusestamm und infizierten Wildtyp-Mäusen. Die C3aR-Gendefizienz hatte keinerlei Effekt auf den Krankheitsverlauf der Pneumokokken-Meningitis.

In einer weiteren Versuchsserie setzten wir Mäuse ein, die entweder eine Spontanmutation im C6-Gen aufwiesen und dadurch keinen funktionalen terminalen Komplementkomplex bilden konnten oder denen CD59a, ein endogener Inhibitor der terminalen Komplementaktivierung, fehlte. Während die genetische Defizienz von CD59a mit signifikant höheren Leukozytenzahlen im Liquor einherging, waren diese bei den Mäusen mit einer Funktionsverlustmutation im C6-Gen tendenziell niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen. Hohe Albumin-Konzentrationen bei Mäusen mit einer Funktionsverlustmutation im C6-Gen wiesen auf eine schlechtere Funktionsfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke hin und können die erhöhte Sterblichkeitsrate im Vergleich zu Wildtyp- und CD59a-defizienten Mäusen erklären. Bei den anderen oben genannten

Messparametern fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen C6<sup>mutant</sup>-, CD59a-defizienten und Wildtyp-Mäusen.

Im Anschluss daran versuchten wir durch Verwendung von Mäusen, die keinen funktionalen Rezeptor für das Anaphylatoxin C5a (C5aR) exprimierten, die Bedeutung dieses terminalen Komplementfaktors bei der Pneumokokken-Meningitis zu charakterisieren. Die C5aR-defizienten Mäuse zeigten einen äußerst markanten Phänotyp: die Entzündungsreaktion (Liquorpleozytose, Zytokinexpression) war wesentlich geringer ausgeprägt als bei entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Die abgeschwächte Immunreaktion ging mit einer deutlichen Abnahme der neuropathologischen Veränderungen und konsekutiv einer Verbesserung des klinischen Verlaufs einher, ohne aber zu einer Zunahme des bakteriellen Wachstums im Liquorraum zu führen. Kurz zusammengefasst demonstrierten diese Versuchsreihen, dass C5a ein zentraler Regulator in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis ist und daher ein möglicher Angriffspunkt für eine Behandlung dieser Erkrankung sein könnte.

Zur Klärung dieser Frage führten wir zunächst Untersuchungen zur Wirksamkeit des anti-C5-Antikörper BB5.1 (in der Dosierung von 1 mg/Maus) in unserem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis durch. Mit dieser Dosierung wurden in anderen murinen Krankheitsmodellen, wie z. B. dem Ischämie-Reperfusionsschaden (De Vries et al., 2003) oder der Antikörper-vermittelten Glomerulonephritis (Huugen et al., 2007), protektive Effekte erzielt. In dieser Versuchsreihe wurden Mäuse unmittelbar vor der intrazisternalen Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* entweder mit murinen anti-C5 Antikörpern oder Kontroll-IgG (Placebo-Gruppe) behandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Mäuse klinisch, mikrobiologisch und histopathologisch untersucht. Bei Mäusen, die mit dem funktionsblockierenden Antikörper vorbehandelt worden waren, waren die zerebralen Konzentrationen von terminalem Komplementkomplex im Gehirn signifikant niedriger als in der Placebo-Vergleichsgruppe. Die Vorbehandlung mit anti-C5-Antikörpern führte zudem zu einer signifikanten Reduktion der Liquor-Zellzahlen. Die Abschwächung der Entzündungsreaktion war zudem mit einem besseren klinischen Status der Mäuse vergesellschaftet. Somit zeigte diese Versuchsreihe, dass der anti-C5 Antikörper BB5.1 in einer Dosierung von 1 mg/Maus die meningeale Entzündungsreaktion supprimieren und die Entwicklung intrakranieller Komplikationen reduzieren kann.

In einer abschließenden Versuchsreihe testeten wir die Effektivität einer adjuvanten Therapie mit BB5.1 im kliniknahen Mausmodell. Dabei wurden die Mäuse unmittelbar vor Beginn der Antibiotika-Therapie, d.h. 24 Stunden nach der Infektion, mit 1 mg BB5.1

oder Kontroll-IgG (in der Placebo-Gruppe) behandelt. Die zentrale Erkenntnis dieser Versuchsreihe war, dass keine der BB5.1-behandelten Mäuse (0 von 12) im Beobachtungsintervall verstarb, während die Sterblichkeitsrate in der Placebo-Gruppe bei 33 % (7 von 21) lag. Dieser protektive Effekt scheint auf einer Reduktion der intrakraniellen Komplikationen zu beruhen; so waren bei den BB5.1-behandelten Mäusen sowohl die intrazerebralen Einblutungen als auch die Blut-Hirnschrankenstörung geringer ausgeprägt als bei den Placebo-behandelten Mäusen. Erfreulich war zudem, dass durch die anti-C5-Antikörpergabe die Antibiotika-induzierte Elimination der Keime nicht beeinträchtigt wurde. In dieser Versuchsreihe verglichen wir überdies die Wirksamkeit des C5-Antikörpers mit der von (1) Dexamethason sowie (2) von neutralisierenden Antikörpern gegen TLR2 und 4. TLR2 und TLR4 gelten als entscheidende Mustererkennungsrezeptoren bei der Induktion der autodestruktiven Immunreaktion bei der Pneumokokken-Meningitis (Klein et al., 2008). Dexamethason wiederum ist derzeit das einzige immunsuppressive Medikament, für das ein protektiver Effekt auf den Verlauf einer Pneumokokken-Meningitis im Erwachsenenalter berichtet wurde (de Gans et al., 2002). In unserem Modell konnte weder durch die Dexamethason-Gabe noch die Applikation von anti-TLR2/4-Antikörpern die Sterblichkeitsrate signifikant reduziert werden. Auch auf die Entstehung intrakranieller Komplikationen konnten wir keinen signifikanten Effekt dieser Behandlungsmaßnahmen feststellen. Damit demonstrierten diese Versuchsreihen, dass eine adjuvante Therapie mit anti-C5-Antikörpern den Krankheitsverlauf einer Pneumokokken-Meningitis positiv beeinflussen kann und in seiner Wirksamkeit der gängigen Behandlung mit Dexamethason deutlich überlegen ist. Die pharmakologische Inhibition von C5 könnte somit einen viel versprechenden Ansatz für die adjuvante Therapie der Pneumokokken-Meningitis darstellen. Um zu einem abschließenden Urteil zu kommen, sind noch weitere Untersuchungen (z.B. zum therapeutischen Fenster oder zur Wirksamkeit gegenüber Langzeitkomplikationen) notwendig.

## 6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die adjuvante Therapie mit anti-C5-Antikörpern in Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis die Mortalität und das Auftreten von intrakraniellen Komplikationen im Akutstadium der Erkrankung deutlich vermindern kann. Darüber hinaus war die Wirksamkeit dieses Behandlungsansatzes deutlich höher als die der derzeitigen adjuvanten Standardtherapie mit Dexamethason.

In weiteren Untersuchungen soll nun geprüft werden, ob diese adjuvante Therapiestrategie auch dann noch wirksam ist, wenn die anti-C5-Antikörper nach dem Beginn der antimikrobiellen Behandlung verabreicht werden. Sollte dem so sein, soll überdies das therapeutische Fenster bestimmt werden, d.h. das Zeitintervall charakterisiert werden, in dem die Gabe von anti-C5a-Antikörpern nach dem Beginn der antimikrobiellen Therapie noch wirksam ist. Diese Versuchsreihe ist für die klinische Umsetzung von großer Bedeutung, da bereits bei Verdacht auf bakterielle Meningitis mit einer kalkulierten Antibiotikatherapie begonnen werden muss und somit Patienten oft schon vorbehandelt in das Krankenhaus eingeliefert werden.

In einer zusätzlichen Untersuchungsreihe soll getestet werden, ob die Gabe von anti-C5a-Antikörpern, die ja in der Akutphase der Erkrankung eine starke protektive Wirkung zeigte, auch die Entwicklung Meningitis-assoziiierter Langzeit-Folgeschäden (wie Hörschaden, Gedächtnis/Merkstörung) verhindern kann.

In einer weiteren Versuchsreihe soll die Wirkung der anti-C5-Antikörpertherapie bei anderen Formen der bakteriellen Meningitis, insbesondere der Meningokokken-Meningitis, evaluiert werden. Da in der Klinik bei Verdacht auf Meningitis eine kalkulierte Therapie ohne vorherigen Erregernachweis begonnen werden muss, sollte die Behandlung mit anti-C5-Antikörpern bei anderen Meningitiserregern keine nachteiligen Effekte haben.

Meningokokken (nicht aber Pneumokokken) können jedoch durch das Immunsystem mittels Membran-Angriffskomplex C5b-C9 abgetötet werden (Sprong et al., 2003). Eine Therapie mit anti-C5-Antikörpern, die auch die Bildung des terminalen Komplementkomplexes blockiert, könnte in diesem Fall den Krankheitsverlauf ungünstig beeinflussen. In einem in vitro-Modell der Meningokokkensepsis (Vollblutsystem) zeigten Sprong et al. (2003), dass eine Behandlung mit C5-Antikörpern die Bildung des Membranangriffskomplexes und folglich die bakterielle Elimination inhibieren kann. Dieser Effekt wurde bei Gabe eines selektiven C5a-Antikörpers nicht beobachtet. Sollte

die Behandlung mit C5-Antikörpern im Tiermodell das bakterielle Wachstum begünstigen und sich ungünstig auf die bakterizide Wirkung entsprechender antimikrobieller Arzneimittel auswirken, könnte anstelle des C5-Antikörpers der Einsatz eines selektiven C5a-Antikörpers in der Behandlung der bakteriellen Meningitis erwogen werden.

Wenn all diese Versuchsreihen positive Resultate liefern sollten, sollte die Einführung dieser Behandlungsmethode in die Klinik angestrebt werden. Von großem Vorteil wäre dabei, dass anti-C5-Antikörper (Eculizumab) (Hillmen et al., 2006) schon seit geraumer Zeit für den klinischen Einsatz zugelassen sind und zurzeit Verwendung in der Behandlung der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinämie und des atypischen hämolytischen, urämischen Syndroms finden (Greenbaum et al., 2011; Nurnberger et al., 2009; Rother et al., 2007). Auch Patienten mit hämolytischem urämischem Syndrom durch Infektion mit *enterohämorrhagischen Escherichia coli* (EHEC) werden inzwischen mit Eculizumab therapiert (Kielstein et al., 2012; Kielstein et al., 2012), wobei auch hier seine Wirksamkeit vermutlich auf dessen anti-inflammatorischer Wirkung beruht.

## 7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister und Herrn apl. Prof. Dr. med. Uwe Ködel an der Neurologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum Großhadern der Universität München erstellt. Ich bedanke mich sehr für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Neuroinfektiologie“. Die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre schätzte ich stets sehr. Vor allem Herrn apl. Professor Ködel danke ich nicht nur für die hervorragende Einarbeitung und Betreuung in der experimentellen Phase, sondern auch für die kontinuierliche Unterstützung bei anfallenden Problemen. Seine stetige Bereitschaft zum wissenschaftlichen Dialog hinsichtlich Auswertung und Einordnung der gewonnenen Ergebnisse waren eine große Hilfe.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Barbara Angele für ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente. Ihre wertvollen Ratschläge und die Beantwortung auftretender Fragen ermöglichten die schnelle und erfolgreiche Umsetzung des Versuchsplans.

Frau Dr. Bianca Wöhrle und Herrn Dr. Matthias Klein danke ich zudem für die Vorarbeit bezüglich des Komplementsystems bei der bakteriellen Meningitis sowie für ihre freundliche Unterstützung.

Bezüglich der immunhistochemischen Untersuchungen danke ich Frau Angelika Henn, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU und Herrn Sven Hammerschmitt, Universität Greifswald für die Bereitstellung der Erregerstämme von *Streptococcus pneumoniae*.

Die Liquorproben (inkl. anonymisierter laborchemischer und klinischer Daten) wurden uns von unserem Kooperationspartner Prof. Diederik van de Beek (Neurologische Abteilung, Universität Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Hierfür bedanke ich mich sehr.

## 8 Literaturverzeichnis

*Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS et al.* (2012). "The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection." PLoS Pathog **8**(7): e1002793.

*Amara U, Rittirsch D, Flierl M et al.* (2008). "Interaction between the coagulation and complement system." Adv Exp Med Biol **632**: 71-9.

*Arda B, Sipahi OR, Atalay S et al.* (2008). "Pooled analysis of 2,408 cases of acute adult purulent meningitis from Turkey." Med Princ Pract **17**(1): 76-9.

*Arumugam TV, Woodruff TM, Lathia JD et al.* (2009). "Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy." Neuroscience **158**(3): 1074-89.

*Barichello T, Santos AL, Silvestre C et al.* (2011). "Dexamethasone treatment reverses cognitive impairment but increases brain oxidative stress in rats submitted to pneumococcal meningitis." Oxid Med Cell Longev **2011**: 173035.

*Bederson J.B. PMH, Tsuji, M C Nishimura, R L Davis and H Bartkowski* (1986). "Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination." Stroke, Journal of American Heart Association **STR.17.3.472**(17:472-476).

*Bengtson A and Heideman M* (1986). "Altered anaphylatoxin activity during induced hypoperfusion in acute and elective abdominal aortic surgery." J Trauma **26**(7): 631-7.

*Borregaard N* (2010). "Neutrophils, from marrow to microbes." Immunity **33**(5): 657-70.

*Bossi F, Fischetti F, Pellis V et al.* (2004). "Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex." J Immunol **173**(11): 6921-7.

*Brouwer MC, McIntyre P, de Gans J et al.* (2010a). "Corticosteroids for acute bacterial meningitis." Cochrane Database Syst Rev(9): CD004405.

*Brouwer MC, Tunkel AR and van de Beek D* (2010b). "Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis." Clin Microbiol Rev **23**(3): 467-92.



- Brouwer MC, McIntyre P, Prasad K et al.* (2013). "Corticosteroids for acute bacterial meningitis." Cochrane Database Syst Rev **6**: CD004405.
- Brown JS, Hussell T, Gilliland SM et al.* (2002). "The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16969-74.
- Buchanan N and Macnab G* (1972). "Cerebrospinal fluid complement and immunoglobulins in meningitis and encephalitis." S Afr Med J **46**(38): 1376-82.
- Buras JA, Rice L, Orlow D et al.* (2004). "Inhibition of C5 or absence of C6 protects from sepsis mortality." Immunobiology **209**(8): 629-35.
- Casarsa C, De Luigi A, Pausa M et al.* (2003). "Intracerebroventricular injection of the terminal complement complex causes inflammatory reaction in the rat brain." Eur J Immunol **33**(5): 1260-70.
- Coimbra RS, Loquet G and Leib SL* (2007). "Limited efficacy of adjuvant therapy with dexamethasone in preventing hearing loss due to experimental pneumococcal meningitis in the infant rat." Pediatr Res **62**(3): 291-4.
- Coxon A, Tang T and Mayadas TN* (1999). "Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **190**(7): 923-34.
- Daffern PJ, Pfeifer PH, Ember JA et al.* (1995). "C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation." J Exp Med **181**(6): 2119-27.
- de Agostini A, Lijnen HR, Pixley RA et al.* (1984). "Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C-1-inhibitor." J Clin Invest **73**(6): 1542-9.
- de Gans J and van de Beek D* (2002). "Dexamethasone in adults with bacterial meningitis." N Engl J Med **347**(20): 1549-56.
- De Vries B, Matthijsen RA, Wolfs TG et al.* (2003). "Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reperfusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation." Transplantation **75**(3): 375-82.

- Dujardin BC, Driedijk PC, Roijers AF et al.* (1985). "The determination of the complement components C1q, C4 and C3 in serum and cerebrospinal fluid by radioimmunoassay." J Immunol Methods **80**(2): 227-37.
- Elsner J, Oppermann M, Czech W et al.* (1994). "C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins." Blood **83**(11): 3324-31.
- Ernst JD, Decazes JM and Sande MA* (1983). "Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis." Infect Immun **41**(1): 275-9.
- Ernst JD, Hartiala KT, Goldstein IM et al.* (1984). "Complement (C5)-derived chemotactic activity accounts for accumulation of polymorphonuclear leukocytes in cerebrospinal fluid of rabbits with pneumococcal meningitis." Infect Immun **46**(1): 81-6.
- Faustmann PM, Krause D, Dux R et al.* (1995). "Morphological study in the early stages of complement C5a fragment-induced experimental meningitis: activation of macrophages and astrocytes." Acta Neuropathol **89**(3): 239-47.
- Fischer WH and Hugli TE* (1997). "Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response." J Immunol **159**(9): 4279-86.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA et al.* (2008). "Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis." FASEB J **22**(10): 3483-90.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R et al.* (2010). "Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease." J Innate Immun **2**(3): 216-27.
- Frank MM, Joiner K and Hammer C* (1987). "The function of antibody and complement in the lysis of bacteria." Rev Infect Dis **9 Suppl 5**: S537-45.
- Fu Q, Satyaswaroop PG and Gowda DC* (1997). "Tissue targeting and plasma clearance of cobra venom factor in mice." Biochem Biophys Res Commun **231**(2): 316-20.
- Gasque P* (2004). "Complement: a unique innate immune sensor for danger signals." Mol Immunol **41**(11): 1089-98.

- Geering B, Stoeckle C, Conus S et al.* (2013). "Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils." Trends Immunol **34**(8): 398-409.
- Gould T D DDT, Kovacsics C E* (2009). "The Open Field Test." Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests **42**(10.1007/978-1-60761-303-9\_1): 1-20.
- Greenbaum L, Babu S, Furman RR et al.* (2011). "Eculizumab Is An Effective Long-Term Treatment In Patients with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) Resistant to Plasma Exchange/Infusion (PE/PI): Results of An Extension Study." Blood **118**(21): 91-92.
- Greenwood BM* (1978). "Chemotactic activity of cerebrospinal fluid in pyogenic meningitis." J Clin Pathol **31**(3): 213-6.
- Guo RF and Ward PA* (2005). "Role of C5a in inflammatory responses." Annu Rev Immunol **23**: 821-52.
- Guo RF, Sun L, Gao H et al.* (2006). "In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis." J Leukoc Biol **80**(6): 1575-83.
- Haas PJ and van Strijp J* (2007). "Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation." Immunol Res **37**(3): 161-75.
- Hawlish H, Wills-Karp M, Karp CL et al.* (2004). "The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma." Mol Immunol **41**(2-3): 123-31.
- Haynes DR, Harkin DG, Bignold LP et al.* (2000). "Inhibition of C5a-induced neutrophil chemotaxis and macrophage cytokine production in vitro by a new C5a receptor antagonist." Biochem Pharmacol **60**(5): 729-33.
- Hillmen P, Young NS, Schubert J et al.* (2006). "The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." N Engl J Med **355**(12): 1233-43.
- Hoegen T, Tremel N, Klein M et al.* (2011). "The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release." J Immunol **187**(10): 5440-51.

- Hoehlig K, Maasch C, Shushakova N et al.* (2013). "A Novel C5a-neutralizing Mirror-image (l-)Aptamer Prevents Organ Failure and Improves Survival in Experimental Sepsis." Mol Ther **21**(12): 2236-46.
- Hollmann TJ, Mueller-Ortiz SL, Braun MC et al.* (2008). "Disruption of the C5a receptor gene increases resistance to acute Gram-negative bacteremia and endotoxic shock: opposing roles of C3a and C5a." Mol Immunol **45**(7): 1907-15.
- Huber-Lang MS, Riedeman NC, Sarma JV et al.* (2002). "Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice." FASEB J **16**(12): 1567-74.
- Hugli TE* (1981). "The structural basis for anaphylatoxin and chemotactic functions of C3a, C4a, and C5a." Crit Rev Immunol **1**(4): 321-66.
- Huugen D, van Esch A, Xiao H et al.* (2007). "Inhibition of complement factor C5 protects against anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis in mice." Kidney Int **71**(7): 646-54.
- Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS et al.* (2001). "Apoptosis of leukocytes: basic concepts and implications in uremia." Kidney Int Suppl **78**: S197-205.
- Jain M, Aneja S, Mehta G et al.* (2000). "CSF interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and free radicals production in relation to clinical outcome in acute bacterial meningitis." Indian Pediatr **37**(6): 608-14.
- Jennett B and Bond M* (1975). "Assessment of outcome after severe brain damage." Lancet **1**(7905): 480-4.
- Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C et al.* (2004). "Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species." Cerebrospinal Fluid Res **1**(1): 2.
- Joiner KA, Brown EJ and Frank MM* (1984). "Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense." Annu Rev Immunol **2**: 461-91.
- Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF et al.* (2002). "Oxidative stress in bacterial meningitis in humans." Neurology **58**(2): 186-91.

*Kastenbauer S and Pfister HW* (2003). "Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases." Brain **126**(Pt 5): 1015-25.

*Kennedy AD and DeLeo FR* (2009). "Neutrophil apoptosis and the resolution of infection." Immunol Res **43**(1-3): 25-61.

*Kielstein JT, Beutel G, Fleig S et al.* (2012). "Best supportive care and therapeutic plasma exchange with or without eculizumab in Shiga-toxin-producing E. coli O104:H4 induced haemolytic-uraemic syndrome: an analysis of the German STEC-HUS registry." Nephrol Dial Transplant **27**(10): 3807-15.

*Kildsgaard J, Hollmann TJ, Matthews KW et al.* (2000). "Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock." J Immunol **165**(10): 5406-9.

*Kilgore KS, Flory CM, Miller BF et al.* (1996). "The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells." Am J Pathol **149**(3): 953-61.

*Kim KS* (2003). "Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury." Nat Rev Neurosci **4**(5): 376-85.

*Kirschfink M and Nurnberger W* (1999). "C1 inhibitor in anti-inflammatory therapy: from animal experiment to clinical application." Mol Immunol **36**(4-5): 225-32.

*Klein M, Koedel U and Pfister HW* (2006a). "Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy?" Prog Neurobiol **80**(6): 269-80.

*Klein M, Paul R, Angele B et al.* (2006b). "Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis." Microbes Infect **8**(4): 974-83.

*Klein M, Obermaier B, Angele B et al.* (2008). "Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Infect Dis **198**(7): 1028-36.

*Kock MA, Hew BE, Bammert H et al.* (2004). "Structure and function of recombinant cobra venom factor." J Biol Chem **279**(29): 30836-43.

- Koedel U and Pfister HW* (1999). "Oxidative stress in bacterial meningitis." Brain Pathol **9**(1): 57-67.
- Koedel U, Bayerlein I, Paul R et al.* (2000). "Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis." J Infect Dis **182**(5): 1437-45.
- Koedel U, Scheld WM and Pfister HW* (2002a). "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." Lancet Infect Dis **2**(12): 721-36.
- Koedel U, Winkler F, Angele B et al.* (2002b). "Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice." Ann Neurol **51**(3): 319-29.
- Koedel U, Rupprecht T, Angele B et al.* (2004). "MyD88 is required for mounting a robust host immune response to Streptococcus pneumoniae in the CNS." Brain **127**(Pt 6): 1437-45.
- Koedel U* (2009). "Toll-like receptors in bacterial meningitis." Curr Top Microbiol Immunol **336**: 15-40.
- Koedel U, Frankenberg T, Kirschnek S et al.* (2009). "Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis." PLoS Pathog **5**(5): e1000461.
- Koedel U, Klein M and Pfister HW* (2010). "New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis." Curr Opin Infect Dis **23**(3): 217-23.
- Kolaczowska E and Kubes P* (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." Nat Rev Immunol **13**(3): 159-75.
- Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS et al.* (1998). "Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis." J Neuroimmunol **85**(1): 33-43.
- Lewis K* (2000). "Programmed death in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 503-14.
- Ley K and Reutershan J* (2006). "Leucocyte-endothelial interactions in health and disease." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 2): 97-133.

- Ley RE, Hamady M, Lozupone C et al.* (2008a). "Evolution of mammals and their gut microbes." Science **320**(5883): 1647-51.
- Ley RE, Lozupone CA, Hamady M et al.* (2008b). "Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota." Nat Rev Microbiol **6**(10): 776-88.
- Libert C, Wielockx B, Grijalba B et al.* (1999). "The role of complement activation in tumour necrosis factor-induced lethal hepatitis." Cytokine **11**(8): 617-25.
- Lutsar I, Friedland IR, Jafri HS et al.* (2003). "Factors influencing the anti-inflammatory effect of dexamethasone therapy in experimental pneumococcal meningitis." J Antimicrob Chemother **52**(4): 651-5.
- Maier S, Traeger T, Entleutner M et al.* (2004). "Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis." Shock **21**(6): 505-11.
- Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM et al.* (2009). "Complement component 5a (C5a)." Int J Biochem Cell Biol **41**(11): 2114-7.
- Marder SR, Chenoweth DE, Goldstein IM et al.* (1985). "Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg." J Immunol **134**(5): 3325-31.
- Meri S, Morgan BP, Davies A et al.* (1990). "Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers." Immunology **71**(1): 1-9.
- Molyneux EM, Walsh AL, Forsyth H et al.* (2002). "Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: a randomised controlled trial." Lancet **360**(9328): 211-8.
- Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T et al.* (2011). "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." Clin Microbiol Rev **24**(3): 557-91.
- Nau R and Bruck W* (2002). "Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy." Trends Neurosci **25**(1): 38-45.

- Niederkorn JY* (2006). "See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege." Nat Immunol **7**(4): 354-9.
- Nurnberger J, Philipp T, Witzke O et al.* (2009). "Eculizumab for atypical hemolytic-uremic syndrome." N Engl J Med **360**(5): 542-4.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP et al.* (2009). "Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates." Lancet. **374**(9693):893-902.
- Pachter JS, de Vries HE and Fabry Z* (2003). "The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **62**(6): 593-604.
- Peltola H, Roine I, Fernandez J et al.* (2007). "Adjuvant glycerol and/or dexamethasone to improve the outcomes of childhood bacterial meningitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Clin Infect Dis **45**(10): 1277-86.
- Perianayagam MC, Balakrishnan VS, King AJ et al.* (2002). "C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway." Kidney Int **61**(2): 456-63.
- Perianayagam MC, Balakrishnan VS, Pereira BJ et al.* (2004). "C5a delays apoptosis of human neutrophils via an extracellular signal-regulated kinase and Bad-mediated signalling pathway." Eur J Clin Invest **34**(1): 50-6.
- Pfister HW, Feiden W and Einhaupl KM* (1993). "Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study." Arch Neurol **50**(6): 575-81.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K et al.* (2010). "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." Nat Immunol **11**(9): 785-97.
- Rother RP, Rollins SA, Mojciak CF et al.* (2007). "Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Nat Biotechnol **25**(11): 1256-64.



*Rupprecht TA, Angele B, Klein M et al.* (2007). "Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system." J Immunol **178**(3): 1861-9.

*Sacks T, Moldow CF, Craddock PR et al.* (1978). "Endothelial damage provoked by toxic oxygen radicals released from complement-triggered granulocytes." Prog Clin Biol Res **21**: 719-26.

*Scarborough M, Gordon SB, Whitty CJ et al.* (2007). "Corticosteroids for bacterial meningitis in adults in sub-Saharan Africa." N Engl J Med **357**(24): 2441-50.

*Schapira M, de Agostini A, Schifferli JA et al.* (1985). "Biochemistry and pathophysiology of human C1 inhibitor: current issues." Complement **2**(2-3): 111-26.

*Schneider O, Michel U, Zysk G et al.* (1999). "Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations." Neurology **53**(7): 1584-7.

*Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L et al.* (2002). "Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells." J Immunol **169**(4): 2102-10.

*Simberkoff MS, Moldover NH and Rahal J, Jr.* (1980). "Absence of detectable bactericidal and opsonic activities in normal and infected human cerebrospinal fluids. A regional host defense deficiency." J Lab Clin Med **95**(3): 362-72.

*Skattum L, van Deuren M, van der Poll T et al.* (2011). "Complement deficiency states and associated infections." Mol Immunol **48**(14): 1643-55.

*Spanaus KS, Nadal D, Pfister HW et al.* (1997). "C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro." J Immunol **158**(4): 1956-64.

*Sprong T, Brandtzaeg P, Fung M et al.* (2003). "Inhibition of C5a-induced inflammation with preserved C5b-9-mediated bactericidal activity in a human whole blood model of meningococcal sepsis." Blood **102**(10): 3702-10.

*Squier MK, Sehnert AJ and Cohen JJ* (1995). "Apoptosis in leukocytes." J Leukoc Biol **57**(1): 2-10.

*Stahel PF, Frei K, Eugster HP et al.* (1997a). "TNF-alpha-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria* meningoencephalitis." J Immunol **159**(2): 861-9.

*Stahel PF, Frei K, Fontana A et al.* (1997b). "Evidence for intrathecal synthesis of alternative pathway complement activation proteins in experimental meningitis." Am J Pathol **151**(4): 897-904.

*Stahel PF, Nadal D, Pfister HW et al.* (1997c). "Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis." Lancet **349**(9069): 1886-7.

*Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Perez D et al.* (2001). "Intrathecal levels of complement-derived soluble membrane attack complex (sC5b-9) correlate with blood-brain barrier dysfunction in patients with traumatic brain injury." J Neurotrauma **18**(8): 773-81.

*Strieter RM, Kasahara K, Allen RM et al.* (1992). "Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8." Am J Pathol **141**(2): 397-407.

*Summers C, Rankin SM, Condliffe AM et al.* (2010). "Neutrophil kinetics in health and disease." Trends Immunol **31**(8): 318-24.

*Takabayashi T, Vannier E, Clark BD et al.* (1996). "A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis." J Immunol **156**(9): 3455-60.

*Taylor PW* (1992). "Complement-mediated killing of susceptible gram-negative bacteria: an elusive mechanism." Exp Clin Immunogenet **9**(1): 48-56.

*Teasdale G and Jennett B* (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale." Lancet **2**(7872): 81-4.

*Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE et al.* (2011). "Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007." N Engl J Med **364**(21): 2016-25.

*Tin Tin HM, Madhava H, Balmer P. et al.* 2013 "A review of the impact of pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (7-valent) on pneumococcal meningitis." Adv Ther. **30**(8):748-762

- Tomlinson S, Taylor PW, Morgan BP et al.* (1989). "Killing of gram-negative bacteria by complement. Fractionation of cell membranes after complement C5b-9 deposition on to the surface of *Salmonella minnesota* Re595." Biochem J **263**(2): 505-11.
- Tsuchiya K, Toyama K, Tsuprun V et al.* (2007). "Pneumococcal peptidoglycan-polysaccharides induce the expression of interleukin-8 in airway epithelial cells by way of nuclear factor-kappaB, nuclear factor interleukin-6, or activation protein-1 dependent mechanisms." Laryngoscope **117**(1): 86-91.
- Tuomanen E, Liu H, Hengstler B et al.* (1985). "The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall." J Infect Dis **151**(5): 859-68.
- Tuomanen E, Hengstler B, Zak O et al.* (1986). "The role of complement in inflammation during experimental pneumococcal meningitis." Microb Pathog **1**(1): 15-32.
- Tyler KL* (2008). "Bacterial meningitis: an urgent need for further progress to reduce mortality and morbidity." Neurology **70**(22 Pt 2): 2095-6.
- van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L et al.* (2004). "Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis." N Engl J Med **351**(18): 1849-59.
- van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR et al.* (2006). "Community-acquired bacterial meningitis in adults." N Engl J Med **354**(1): 44-53.
- van de Beek D, de Gans J, McIntyre P et al.* (2007). "Corticosteroids for acute bacterial meningitis." Cochrane Database Syst Rev(1): CD004405.
- van de Beek D*, (2012). "Progress and challenges in bacterial meningitis." Lancet: **380** (9854):1623-4
- van Epps DE and Chenoweth DE* (1984). "Analysis of the binding of fluorescent C5a and C3a to human peripheral blood leukocytes." J Immunol **132**(6): 2862-7.
- van Hinsbergh VW* (2012). "Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation." Semin Immunopathol **34**(1): 93-106.
- van der Linden M, Weiss S, Falkenhorst G et al.* (2012) "Four years of universal pneumococcal conjugate infant vaccination in Germany: Impact on incidence of invasive pneumococcal disease and serotype distribution in children." Vaccine **30**(40):5880-5.

Vardakas KZ, Matthaiou DK and Falagas ME (2009). "Adjunctive dexamethasone therapy for bacterial meningitis in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials." Eur J Neurol **16**(6): 662-73.

Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB et al. (1997). "Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement." J Immunol **158**(2): 945-53.

Weber JR and Tuomanen EI (2007). "Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity." J Neuroimmunol **184**(1-2): 45-52.

Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L et al. (2006). "Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series." Lancet Neurol **5**(2): 123-9.

WHO, San Francisco, Annual Report of Communicable Diseases, 2003

Woehrl B, Brouwer MC, Murr C et al. (2011). "Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis." J Clin Invest **121**(10): 3943-53.

Yuan Y, Ren J, Wu X et al. (2011). "Exogenous C3 postpones complement exhaustion and confers organ protection in murine sepsis." J Surg Res **168**(1): e87-94.

Zarbock A and Ley K (2008). "Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium." Am J Pathol **172**(1): 1-7.

Zwahlen A, Nydegger UE, Vaudaux P et al. (1982). "Complement-mediated opsonic activity in normal and infected human cerebrospinal fluid: early response during bacterial meningitis." J Infect Dis **145**(5): 635-46.

Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S et al. (2003). "IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis." J Immunol **170**(9): 4724-30.

Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S et al. (2007). "C1 inhibitor treatment improves host defense in pneumococcal meningitis in rats and mice." J Infect Dis **196**(1): 115-23.